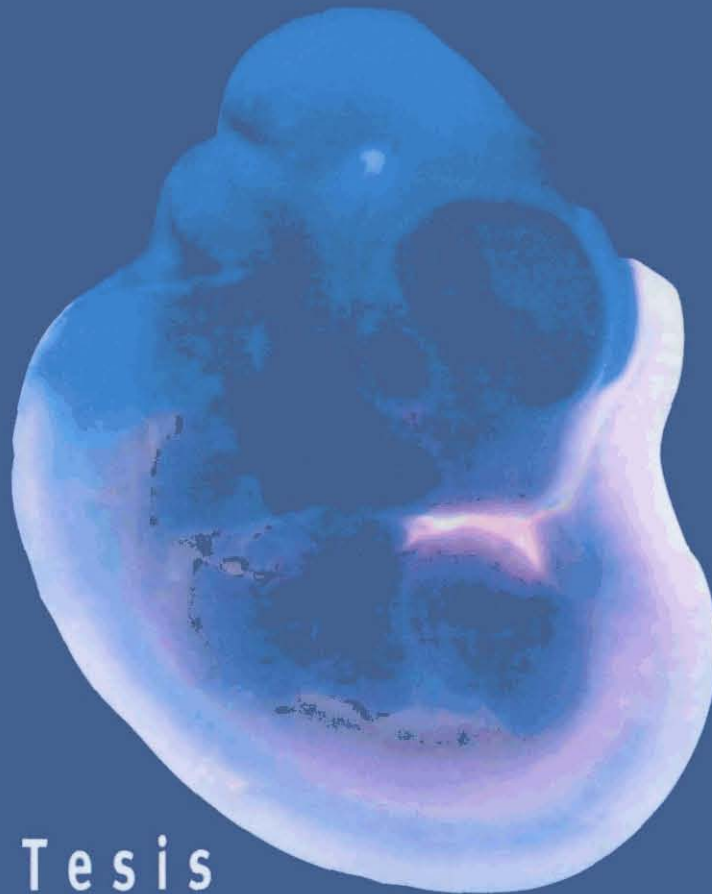


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
Departamento de Bioquímica

Estudio del gen POMT1 y su implicación en enfermedades neuromusculares. Generación de animales modelo en el ratón



Tesis
Doctoral

Belén
Prados
Pinto

Madrid, 2006

Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de sobresaliente "Cum laude" (unanimidad)
Madrid, 2 de Febrero de 2006



The block contains five handwritten signatures. At the top left is a black signature. Below it is a blue signature. To the right of the blue signature is another blue signature. Below the first blue signature is a red signature. At the bottom right is a long, flowing blue signature.

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Estudio del gen *POMT1* y su implicación en
enfermedades neuromusculares.
Generación de animales modelo en el ratón**

Memoria que presenta, para optar al grado
de doctora, la licenciada en Bioquímica por la
Universidad Autónoma de Madrid

Belén Prados Pinto

Director: **Jesús Cruces Pinto**
Profesor Titular de la Universidad Autónoma
de Madrid

UNIVERSIDAD AUTONOMA MADRID
REGISTRO GENERAL

Entrada 01 Nº. 200600000065
09/01/06 12:02:16

Reg. F.M. 25.622
30cm.



Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

Madrid, Enero 2006



Facultad de Medicina
c/ Arzobispo Morcillo, 4
28029-Madrid

D. Jesús CRUCES PINTO, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

CERTIFICA,

Que la tesis doctoral titulada "Estudio del gen *POMT1* y su implicación en enfermedades neuromusculares. Generación de animales modelo en el ratón" ha sido realizada en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Como director de la mencionada tesis doctoral estoy de acuerdo con los métodos empleados y los resultados obtenidos, por lo que considero que reúne los requisitos necesarios de originalidad y calidad para que sea presentada y defendida ante un tribunal con el fin de optar al grado de Doctor.

Madrid, 19 de diciembre de 2005

Fdo.: Dr. Jesús Cruces Pinto
Director de la tesis

a mis padres
a Óscar

AGRADECIMIENTOS

Es bastante probable que a estas alturas se me olvide mencionar a alguien. En cierto modo, si estáis leyendo esto, estáis aquí. Espero que me perdonéis, ya que me está resultando más difícil escribir esto que el resto de la Tesis.

Aquí tenéis mi granito de arena por la Ciencia. Ahora sólo me queda plantar un árbol y tener un hijo, pero si por plantar un árbol aceptamos plantar fresas o tomates, sólo me queda tener un hijo.

En primer lugar, tengo que dar las gracias a la gente de mi antiguo labo en el CBM (el CX-450, del que guardo muy buenos recuerdos), por enseñarme a trabajar en la poyata y por todos los buenos momentos.

A Jesús, por supuesto, que me dio la oportunidad de trabajar en su laboratorio sin tener en cuenta mi expediente (gracias a eso estoy a punto de leer...), por su apoyo y confianza, y por su ayuda durante todos estos años.

A Juanma, por enseñarme a trabajar con levaduras y un montón de trucos para clonar.

A las alumnas del Ciudad de Jaén (Paqui, Henar, Eva G., Elena y Sara), a Bea, a los técnicos FINNOVA (Eva G. y Raúl) que me dieron la oportunidad de enseñarles y con los que aprendí mucho. Con todos ha sido muy fácil trabajar y todos han sido de mucha ayuda. La verdad, me ha encantado hacer de "profe". Y a Nacho y a Pedro, que también pasaron por el labo aunque no estuvieron bajo mi "tutela".

A Carmen, por todo el tiempo que pasó conmigo (muchos días hasta las tantas e incluso algún fin de semana estupendo de Junio) en el laboratorio "deshaciendo entuertos", intentando encajar en una las distintas versiones del artículo incluyendo la del "indígena". Al final quedó bonito.

A Rocío, a Almu, a Eva B, Eva G. y a Raúl (aunque algunos ya se hayan ido), por hacer más amena la estancia en el labo, por las risas que nos echamos, sobre todo cuando nos da por meter la pata (a mí la primera).

A Marlon, por las electroporaciones y por ser muy buen compañero de trabajo a distancia.

Al B-19: a Pili, a Cris, a Pablo, a Miguel y a los demás, que siempre me dejan todo lo que les pido.

A la gente del B-18, donde he estado dando la plasta a Jorge, a Elena, a Raquel y a Juan (sobre todo a estos dos): "vengo a pedir...", o "tengo una duda..." o "necesito ayuda...", porque me han solucionado casi siempre todos mis problemas; y a Susana (ahora del B-20), por ayudarme con el microscopio de fluorescencia. Pero ante todo, por permitirme "agregarme" a sus piscolabis y participar en sus "marujismos".

A las niñas del B-15 (Pili, Maite, Cris y la no tan niña Susana), por hacer que las comidas sean muy amenas.

A la gente del animalario: Pablo, Ángel, Elena y Fernando (por enseñarme muchas cosas sobre los ra -

toncillos), pero principalmente a Saleta (más conocida como "Solete"), por cuidar de mis bichitos durante todo este tiempo y tratarlos fenomenal.

A la Dra. Álvarez Nieto por su amistad y por mil cosas más. En lo que respecta a esta Tesis, por su "asesoramiento científico" y sus críticas (aunque me hubiera gustado que hubiera podido hacer más). Pero lo más importante es que ha estado ahí para ayudarme siempre que la he necesitado, aunque no estuviese en su mejor momento. Gracias Gemi.

Y para el final dejo a todos los que me han sufrido más de cerca durante estos últimos meses:

A Canito, por salvarme la vida cuando tiré a la papelera y borré todas las figuras de la Tesis y por ayudarme a recuperarlas. Gracias, gracias, gracias.

A Nieves y a mi hermana Auro (sobre todo a Auro) por la maquetación, porque al final ha quedado una Tesis preciosa (a pesar de las prisas): mil gracias.

A Guille, por hacer que me olvide de todo y por hacerme sonreír siempre.

A mis padres, por soportarme cuando nadie más lo hace, y porque han aguantado con paciencia todas mis quejas o mis lloros cuando algo me ha salido mal, principalmente durante estos últimos meses.

Y a Óscar, primero por los "chismes" que me hizo para el labo que me han sido de mucha utilidad, y segundo y más importante, por estar ahí siempre, por quererme, por aguantarme, y en definitiva, por todo.

Gracias a todos

Resumen

La O-manosilación es una modificación post-traducciona importante en eucariotas. El gen que codifica la proteína O-manosil transferasa 1 en humanos es *POMT1*. El α -dístroglicano, componente del complejo glicoproteico de dístrofina en músculo y neuronas, es O-manosilado por *POMT1*. Existen varias enfermedades neuromusculares cuyos pacientes presentan déficit en la glicosilación del α -dístroglicano. El Síndrome de Walker-Warburg (WWS) es una dístrofia muscular congénita asociada a malformaciones oculares y cerebrales graves, causada por mutaciones en varias proteínas implicadas en la glicosilación del α -dístroglicano, siendo la más frecuente *POMT1*. Durante la embriogénesis del ratón, *Pomt1* se expresa en los mismos tejidos que están más afectados en pacientes con WWS. En el ratón adulto, *Pomt1* se localiza en el R.E. de células musculares y en el acrosoma de las células germinales masculinas. En esta tesis, hemos generado un animal *knockout* para estudiar más a fondo la función de la O-manosilación en el ratón, el cual ha resultado ser letal embrionario debido a defectos en la formación de la membrana de Reichert causados por un déficit de glicosilación del α -dístroglicano. Para evitar la letalidad embrionaria hemos producido quimeras mediante el uso de células ES *Pomt1*^{-/-}, y estamos generando un ratón *knockout* condicional basado en el sistema CRE-loxP, que permita inactivar el gen *Pomt1* espacio-temporalmente mediante el uso de promotores inducibles o específicos de tejido.

Abstract

*O-mannosylation is an important post-translational modification in eukaryotes. The gene that codes the protein O-mannosyl transferase 1 in humans is POMT1. The α -dystroglycan, a component of the dystrophin glycoprotein complex of muscle and neurons is O-mannosylated by POMT1. Several neuromuscular disorders present deficit in glycosylation of the α -dystroglycan. The Walker-Warburg Síndrome (WWS) is a congenital muscular dystrophy associated with severe brain and eye malformations due to mutations in several proteins involved in α -dystroglycan glycosylation like POMT1, which is found mutated more often in WWS patients. During mouse embryogenesis, the *Pomt1* gene is expressed in those tissues mostly affected in WWS patients. In the adult mouse, *Pomt1* is located in the E.R. of muscular cells as well as in the acrosome of male germ cells. In this thesis, we have generated a knockout animal in order to get insight the O-mannosylation function in mouse, which resulted embryonic lethal due to defects in the formation of Reichert's membrane as a result of abnormal glycosylation of α -dystroglycan. In order to avoid the embryonic lethality, we have produced chimeras by using *Pomt1*^{-/-} ES cells, and we are generating a conditional knockout mouse, based on the CRE-loxP system, that allow us to disrupt the *Pomt1* gene space-timely with the use of inducible or tissue-specific promoters.*

ÍNDICE

RESUMEN	9
Clave de Abreviaturas	14
INTRODUCCIÓN	17
1. LA GLICOSILACIÓN EN EUCARIOTAS	17
2. O-MANOSILACIÓN: DESDE LEVADURAS A MAMÍFEROS	18
3. PROTEÍNAS O-MANOSILTRANSFERASAS	19
4. EL DISTROGLICANO EN EL COMPLEJO GLICOPROTEICO DE DISTROFINA	21
5. O-MANOSILACIÓN Y ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES: “DISTROGLICANOPATÍAS”	23
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	29
1. CEPAS BACTERIANAS	29
2. CEPAS DE LEVADURA	29
3. LÍNEAS CELULARES Y CEPAS DE RATÓN	29
3.1. Líneas celulares embrionarias pluripotentes de ratón	29
3.2. Cepas de ratón	29
4. VECTORES DE CLONAJE	29
4.1. Vectores de expresión en levadura	29
4.2. Vectores utilizados en la generación de ratones modificados genéticamente	29
5. OLIGONUCLEÓTIDOS	30
5.1. Oligonucleótidos utilizados en los clonajes de ensayos en levadura	30
5.1.1. Cebadores para construcciones en el vector pGBKT7 o pGADT7	30
5.1.2. Cebadores para ensayos de interacción entre POMT1 y distroglicano	30
5.2. Oligonucleótidos utilizados en la generación de animales modificados genéticamente y en el genotipado de ratones	31
6. SONDAS UTILIZADAS EN HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A MEMBRANA (<i>Northern Blot</i> y <i>Southern Blot</i>), E HIBRIDACIÓN <i>in situ</i>	31
6.1. Sondas de cDNA para <i>Northern Blot</i> e hibridación <i>in situ</i>	31
6.2. Sondas de DNA genómico para <i>Southern Blot</i>	31
7. ANTICUERPOS	32
7.1. Anticuerpos Primarios	32
7.2. Anticuerpos secundarios	32

8. CLONAJE Y TRANSFORMACIÓN EN <i>E. coli</i>	32
9. DOBLE HÍBRIDO DIRIGIDO EN LEVADURAS	32
9.1. Construcciones utilizadas en los ensayos de doble híbrido dirigido	33
9.1.1. Quimeras GAL4-BD en el vector pGBKT7: “cebos”	33
9.1.2. Quimeras GAL4-AD en el vector pGADT7 o pACT2: posibles proteínas de interacción ..	33
9.1.2.1. Plásmidos utilizados en ensayos de homo y heterodimerización	33
9.1.2.2. Plásmidos utilizados en los ensayos de interacción entre POMT1 y dis-	33
troglucano	33
9.1.2.3. Plásmidos procedentes de una genoteca de músculo esquelético utiliza-	33
dos en ensayos de interacción con POMT1 y POMT2	33
9.3. Transformación en levaduras y ensayos de interacción	34
9.3.1. Medio de cultivo y crecimiento	34
9.3.2. Transformación en levaduras	34
10. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO	34
11. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>Pomt1</i> DE RATÓN	34
12. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A MEMBRANA (<i>Northern Blot</i> y <i>Southern</i>	
<i>Blot</i>). HIBRIDACIÓN <i>in situ</i>	34
12.1. Hibridación de RNAs transferidos a membranas (<i>Northern Blot</i>)	34
12.2. Hibridación <i>in situ</i> y análisis histológico	34
12.3. Transferencia de DNA genómico a membranas e hibridación con sondas de DNA (<i>Southern Blot</i>) .	35
13. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE RATÓN E INMUNOTRANSFERENCIA (<i>Western Blot</i>)	35
13.1. Extracción total de proteínas de tejido	35
13.2. Extracción de proteínas de membranas de tejido	35
13.3. Inmunotransferencia de proteínas a membranas e inmunodetección con anticuerpos (<i>Wes-</i>	35
<i>tern Blot</i>)	35
14. INMUNOFUORESCENCIA INDIRECTA EN EMBRIONES Y TEJIDO DE RATÓN	36
15. GENERACIÓN DEL RATÓN <i>KNOCKOUT</i> PARA EL GEN <i>Pomt1</i>	36
15.1. Generación del vector de interrupción génica de <i>Pomt1</i> , pKO-Neo	36
15.2. Cultivo de células ES	36
15.2.1. Medio de cultivo y crecimiento de células ES	36
15.2.2. Obtención de células nutrientes de ES (MEFs: <i>mouse embryonic fibroblast</i>)	36
15.3. Electroporación de DNA plasmídico en células ES e identificación de clones recombinantes ...	37
15.3.1. Electroporación	37
15.3.2. Identificación de clones recombinantes	37
15.3.3. Microinyección de células ES en blastocistos e implantación	37
15.3.4. Determinación del genotipo de ratones	37
16. GENERACIÓN DE QUIMERAS ES ^{<i>Pomt1</i>^{-/-}}	37
16.1. Determinación del grado de quimerismo	38
16.2. Estudios de comportamiento	38
16.2.1. Rota-rod	38
16.2.2. Respuesta auditiva del tallo cerebral (ABR: <i>auditory brainstem response</i>)	38

17. GENERACIÓN DE UN RATÓN <i>KNOCKOUT</i> CONDICIONAL PARA EL GEN <i>Pomt1</i> MEDIANTE EL SISTEMA CRE-Lox-P	39
17.1. Generación del vector pKOc	39
RESULTADOS	41
1. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE POMT1 MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS ..	41
1.1. p38IP y HSJ2 interaccionan con el “loop”1 y el “loop”5 de POMTs	41
1.2. El sistema de doble híbrido no permite detectar formación de dímeros entre POMT o interacción con distroglicano	42
2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN <i>Pomt1</i> murino	42
3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL mRNA Y LA PROTEÍNA POMT1	43
3.1. La expresión de <i>POMT1</i> es similar en tejidos humanos y de ratón adulto	43
3.2. <i>Pomt1</i> se expresa a lo largo de la embriogénesis del ratón	43
3.3. <i>Pomt1</i> se expresa en los tejidos relacionados con WWS durante la embriogénesis	44
3.4. En el ratón adulto <i>Pomt1</i> se expresa en músculo esquelético y corazón, donde el α -distroglicano se encuentra glicosidado	49
3.5. En músculo y corazón de ratón adulto, <i>Pomt1</i> se localiza en el retículo sarcoplasmático, al igual que su homóloga <i>Pomt2</i>	50
3.6. El mRNA de <i>Pomt1</i> se expresa en las células promotoras de las células germinales masculinas, y la proteína se localiza en el acrosoma, un compartimento celular específico de espermátidas	52
3.7. En testículo el principal sustrato de <i>Pomt1</i> y <i>Pomt2</i> se expresa únicamente en la membrana basal de los túbulos seminíferos	55
4. GENERACIÓN Y ESTUDIO DEL RATÓN <i>KNOCKOUT</i> PARA EL GEN <i>Pomt1</i>	56
4.1. La pérdida de <i>Pomt1</i> provoca letalidad durante el desarrollo embrionario del ratón	56
4.2. La pérdida de <i>Pomt1</i> provoca la desorganización de la membrana de Reichert	58
5. GENERACIÓN DE RATONES QUIMERA A PARTIR DE CÉLULAS ES ^{<i>Pomt1</i>-/-}	60
5.1. Obtención de ratones quimera	60
5.2. Los ratones con grado medio de quimerismo mostraron una apariencia y comportamiento normales	62
6. GENERACIÓN DEL RATÓN <i>KNOCKOUT</i> CONDICIONAL PARA EL GEN <i>Pomt1</i>	64
6.1. Obtención de clonejes recombinantes con tres elementos loxP	64
6.2. La obtención del ratón <i>Pomt1</i> ^{loxP/loxP} es el paso previo a la obtención del <i>knockout</i> condicional que ayudará a estudiar la función de <i>Pomt1</i> en cada tejido	66
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	79
BIBLIOGRAFÍA	81
PUBLICACIONES	87

CLAVE DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido
Ade	Adenina
Asn	Asparragina
Asp	Aspártico
BSA	Albúmina de suero bovino, (en inglés <i>Bovine Serum Albumin</i>)
<i>C. albinans</i>	<i>Candida albicans</i>
Células ES	Células Embrionarias Pluripotentes (en inglés <i>Embryonic Stem cells</i>)
cDNA	DNA complementario al mRNA
CMD	Distrofia Muscular Congénita (en inglés <i>Congenital Muscular Dystrophy</i>)
DAPI	en inglés <i>4'-6-Diamidino-2-phenylindole</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DGC	Complejo Glicoproteico de Distrofina (en inglés <i>Dystrophyn Glycoprotein Complex</i>)
DMB	Distrofia muscular de Becker
DMD	Distrofia muscular de Duchenne
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E7.5	Estadio embrionario 7.5 (en inglés <i>Embryonic Stage 7.5</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Sal disódica de ácido etilen-diamino tetra acético
EGF	Factor epidérmico de crecimiento (en inglés <i>Epidermal growth factor</i>)
EUCIB	En inglés <i>European Collaborative Interespecific Backcross</i>
FCMD	Distrofia muscular congénita de Fukuyama (en inglés <i>Fukuyama type congenital muscular dystrophy</i>)
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (en inglés <i>Fluorescein isothiocyanate</i>)
Fuc	Fucosa
FKRP	Proteína relacionada con fukutina (en inglés <i>fukutin related protein</i>)
Gal	Galactosa
Glc	Glucosa
h.	Horas
His	Histidina
Hsp	Proteína de choque térmico (en inglés <i>Heat shock protein</i>)
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato (en inglés <i>Inositol 1,4,5-trisphosphate</i>)
kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
KO	<i>Knockout</i> , ratón modificado genéticamente por interrupción alélica

LB	Medio Luria-Bertani para crecimiento de <i>E. coli</i>
LCCS	Síndrome de contractura letal congénita (en inglés <i>Lethal congenital contracture syndrome</i>)
LCR	Líquido cefalorraquídeo
Leu	Leucina
LGMD	Distrofia muscular de cintura (en inglés <i>Limb-girdle muscular dystrophy</i>)
LIF	Factor inhibidor de leuquinas (en inglés <i>leukin inhibitory factor</i>)
Man	Manosa
μCi	Microcurios
MDC1C	Distrofia muscular congénita con deficiencia secundaria de merosina (laminina) tipo 1C (en inglés <i>Deficient merosin congenital muscular dystrophy tipo 1C</i>)
MDC1D	Distrofia muscular congénita con deficiencia secundaria de merosina (laminina) tipo 1D (en inglés <i>Deficient merosin congenital muscular dystrophy tipo 1D</i>)
MEB	Enfermedad Músculo-ojo-cerebro (en inglés <i>Muscle-eye-brain disease</i>)
min.	Minutos
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
NAcGal	N-Acetil galactosamina
NAcGlc	N-Acetil glucosamina
NO sintasa	Sintasa de óxido nítrico
O/N	Durante toda la noche (en inglés <i>over night</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (en inglés <i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Solución tamponada con fosfatos (en inglés <i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (en inglés <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PMGS	Gonadotropina de suero de yegua preñada (en inglés <i>pregnant mare's gonadotropin serum</i>)
PMSF	Fenil metil sulfonilo fluoruro (en inglés <i>phenylmethylsulfonylfluoride</i>)
PMT	Proteína manosil transferasa
PNA	Lectina aglutinina de <i>Arachis hypogaea</i> (en inglés <i>peanut agglutinin from Arachis hypogaea</i>)
POMGnT1	Proteína O-manosa β1,2N-acetilglucosaminiltransferasa 1 (en inglés <i>Protein O-mannose β1,2N-acetylglucosaminyltransferase 1</i>)
POMT1	Proteína O-manosil transferasa 1 (<i>H. sapiens sapiens</i>)
Pomt1	Proteína O-manosil transferasa 1 (<i>M. musculus</i>)
POMT2	Proteína O-manosil transferasa 2 (<i>H. sapiens sapiens</i>)
Pomt2	Proteína O-manosil transferasa 2 (<i>M. musculus</i>)
Pro	Prolina
R.E.	Retículo Endoplasmático
RT	Temperatura ambiente (en inglés <i>Room Temperature</i>)
RNA	Ácido ribonucleico
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDF2	Factor derivado del estroma 2 (en inglés <i>stromal derivative factor 2</i>)
SDF2L	Proteína parecida a SDF2 (en inglés <i>SDF2 like</i>)
SDS	Sulfato de dodecilo sódico
Ser	Serina
Sia	Ácido siálico



TBE	Tampón Tris-borato-EDTA
TBS	Solución tamponada con Tris-HCl (en inglés <i>Tris-buffered saline</i>)
TBS-T	TBS con 0,1% Tween 20
Thr	Treonina
Trp	Triptófano
SSC	Solución salina de citrato
UTR	secuencia no traducida (en inglés <i>untranslated region</i>)
WWS	Síndrome de Walker-Warburg (en inglés <i>Walker-Warburg Syndrome</i>)
wt	Fenotipo o genotipo más común que se encuentra en la naturaleza, no modificado genéticamente (en inglés <i>wild-type</i>)
Xyl	Xilosa (en inglés <i>Xylosa</i>)
YNB	Bases nitrogenadas de levadura (en inglés <i>yeast nitrogen base</i>)

INTRODUCCIÓN

El trabajo que voy a presentar es la continuación de un trabajo iniciado hace unos años, cuando nuestro grupo identificó el gen de una proteína implicada en O-manosilación en mamíferos, un tema entonces relativamente nuevo, puesto que se consideraba que ésta era una modificación específica de levaduras y muy rara en mamíferos.

A lo largo de esta introducción y durante la discusión voy a intentar relatar los antecedentes y los hechos que han ido aconteciendo desde entonces. Las hipótesis que nos hemos planteado se han ido resolviendo a partir de todos los datos existentes en la bibliografía aportados por muchos grupos de investigación. En los últimos cinco años, ciertas enfermedades neuromusculares humanas, de las que se conocía bastante poco en lo que a la base molecular y genética se refiere, se han ido relacionando con la O-manosilación. Con nuestro trabajo hemos contribuido y pretendemos seguir contribuyendo a esclarecer algo más la implicación que tienen POMT1 y los O-manosilglicanos en mamíferos.

1. LA GLICOSILACIÓN EN EUCARIOTAS

Las proteínas eucariotas, una vez traducidas, pueden sufrir una serie de modificaciones post-traduccionales que determinarán su estructura secundaria y/o su localización. Una de las modificaciones post-traduccionales más importantes es la glicosilación, por la cual se añaden y se procesan cadenas carbonadas a las proteínas que están madurando. Algunas reacciones de glicosilación ocurren en el lumen del R.E., y otras en el lumen de las cisternas del aparato de Golgi. Existen principalmente dos tipos de glicosilación: N-glicosilación y O-glicosilación, dependiendo de la forma que tienen los residuos glicosídicos de unirse a las proteínas. Así, los N-gli-

canos se unen a los grupos amida de los residuos de Asn, mientras que los O-glicanos se unen al grupo hidroxilo de las Ser o Thr de las proteínas (Spiro, 2002).

Las cadenas de N-glicanos suelen presentar varias ramificaciones. Se sintetizan a partir de precursores de oligosacáridos unidos a dolicol fosfato, que se encuentra formando parte de la membrana de R.E. La síntesis del precursor ocurre en la cara citosólica del R.E. y tiene en común la adición de dos NAcGlc y 5 manosas al dolicol. El precursor se transloca hacia el lado citosólico y se transfiere mediante una transferasa de oligosacárido a residuos de Asn de las proteínas que se están sintetizando, con lo que sería una modificación cotraduccional. La Asn debe estar en una secuencia consenso Asn-X-Ser/Thr, donde X no puede ser ni Pro ni Asp. Estas cadenas de N-glicanos van siendo modificadas por enzimas concretas, ya sean glicosiltransferasas o glicosidasas situadas en el R.E. o en las cisternas del Golgi para formar N-glicanos complejos (Cacan *et al.*, 1998; Schachter, 2000).

Los O-glicanos generalmente son menos complejos, ya que sufren menos procesamientos. Los más conocidos se caracterizan por presentar residuos de N-acetil galactosamina (NAcGal) unidos a los grupos hidroxilo de Ser o Thr de glicoproteínas con dominios tipo mucina (ricos en Ser o Thr). Existen muchos otros tipos de O-glicanos en diferentes glicoproteínas, como el factor de coagulación IX humano o los dominios de tipo EGF de Notch, que presentan residuos de fucosa (O-Fuc); los factores de coagulación bovinos VII y IX, con residuos de glucosa (O-Glc); proteínas citosólicas y nucleares que presentan residuos de N-acetil glucosamina (O-NAcGlc); los proteoglicanos, que contienen cadenas que comienzan con

xilosa (O-Xyl); o el colágeno, que presenta galactosa unida a residuos de hidroxilisisina (O-Gal). Existen por último, varios tipos de proteínas que presentan cadenas de O-manosilglicanos (Endo, 1999; Willer *et al.*, 2003). Todos estos tipos de O-glicosilación están implicados en distintas funciones fisiológicas. Por ejemplo, la O-fucosilación se ha relacionado recientemente con la señalización mediada por Notch, y la ausencia de O-manosilación parece estar implicada en el desarrollo de enfermedades neuromusculares. Existen varias revisiones sobre el proceso de la O-manosilación (Endo, 1999; Willer *et al.*, 2003; Endo, 2004), tema del cual trataremos a continuación.

2. O-MANOSILACIÓN: DESDE LEVADURAS A MAMÍFEROS

La O-manosilación fue descrita en eucariotas por primera vez en levaduras (Sentandreu and Northcote, 1969), y durante muchos años se pensó que era un tipo de glicosilación específica de levaduras. De hecho, es en estos organismos donde la O-manosilación está mejor estudiada. Las cadenas de O-manosilglicanos de levadura están formadas principalmente por residuos de manosa unidos linealmente (Fig. 1). Varios estudios

han demostrado que los O-manosilglicanos son esenciales para mantener la rigidez e integridad de la pared celular en *S. cerevisiae* y con ello la viabilidad celular. En otros hongos como *C. albicans*, la deficiencia de O-manosilación conlleva defectos en distintas funciones celulares incluyendo la disminución de la virulencia del patógeno (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Además de en levaduras y hongos, se han identificado O-manosilglicanos en el colágeno de la cutícula del anélido *Nereis* (Spiro and Bhoyroo, 1980). En eucariotas superiores, más concretamente en *D. melanogaster*, la deficiencia de O-manosilación afecta al desarrollo muscular de la larva y parece ser necesaria para mantener la integridad de la arquitectura de los músculos abdominales del adulto (Martin-Blanco and García-Bellido, 1996).

En mamíferos, la O-manosilación se ha considerado más inusual. Las primeras proteínas en las que se identificaron O-manosilglicanos fueron los proteoglicanos de tipo condroitín-sulfato de cerebro de rata (Finne *et al.*, 1979), y se pensaba que que este tipo de glicosilación estaba restringida únicamente a proteínas de cerebro. Con el tiempo, se han ido identificando estructuras de O-manosilglicanos similares a las encontradas en proteoglicanos cerebrales en un número limitado de glico-

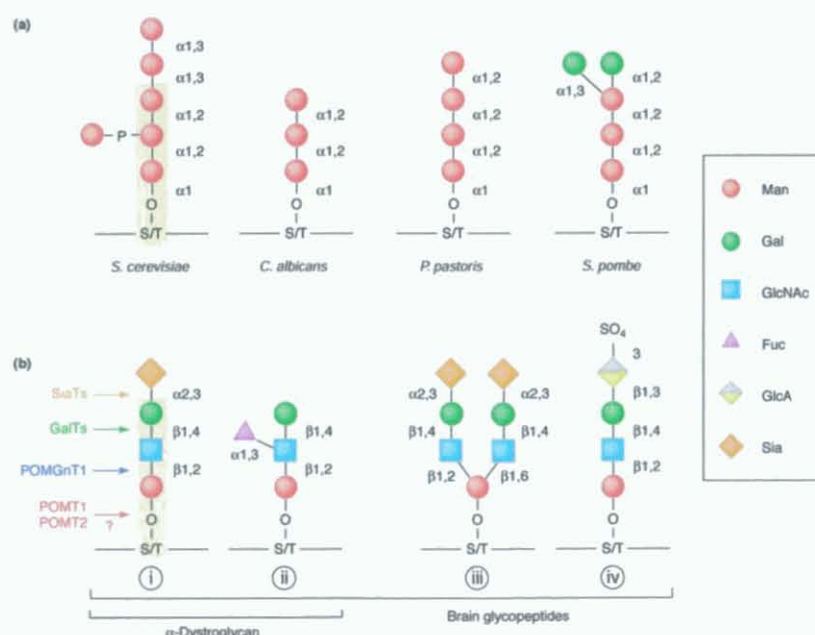


Figura 1. (Willer *et al.*, 2003. *Current Opinion in Structural Biology*). Representación esquemática de estructuras de O-manosilglicanos. Sombreado en amarillo se indica la estructura común a todos los O-manosilglicanos: en levaduras Man-Man-Man-Ser/Thr (a) y en mamíferos Galβ1-4GlcNAcβ1-2-Man-Ser/Thr (b). Estructuras encontradas en el α-distroglicano (i, ii). Estructuras ramificadas encontradas en otras proteínas de cerebro (iii, iv).

proteínas de nervio periférico, cerebro y músculo (revisado en Willer *et al.*, 2003; Endo, 2004). En concreto, se han identificado sialil O-manosilglicanos del tipo Sia α 2-3Gal β 1-4NAcGlc1-2Man-Ser/Thr en el α -dístroglicano tanto de nervio periférico bovino, como de músculo esquelético de conejo y de cerebro de oveja. Es más, parece que estas estructuras participan en la unión del dístroglicano con componentes de la matriz extracelular (Chiba *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1998). En el cerebro de oveja, junto con este tetrasacárido, también se han identificado en el α -dístroglicano estructuras de tipo Gal β 1-4(Fu α 1-3)NAcGlc β 1-2Man-Ser/Thr (Smalheiser *et al.*, 1998) (Fig. 1).

Es probable que existan más tipos de O-manosilglicanos, ramificados o no, que estén aún sin determinar. Hasta el momento, la glicoproteína que contiene gran número de O-manosilglicanos y ha sido mejor caracterizada y estudiada en vertebrados es el α -dístroglicano (Martin, 2003; Cohn, 2005).

3. PROTEÍNAS O-MANOSILTRANSFERASAS

La biosíntesis de O-manosilglicanos en levadura se inicia en el R.E. por una familia de proteínas O-manosil transferasas (PMTs) muy conservada evolutivamente, que transfieren residuos de manosa a partir de dolicol-fosfato-manosa (Dol-P- β -D-Man), a los residuos de Ser o Thr de las proteínas de la ruta de secreción. Esta familia está compuesta, en *S. cerevisiae*, por 7 miembros (ScPmt1-ScPmt7) (Gentzsch and Tanner, 1997). La familia de las PMTs está clasificada filogenéticamente en tres subfamilias PMT1 (ScPmt1 y ScPmt5), PMT2 (ScPmt2, ScPmt3 y ScPmt6) y PMT4 (ScPmt4) (Girrbach *et al.*, 2000).

Aunque han sido estudiadas y caracterizadas más a fondo en levaduras, se han ido identificando homólogos de las PMTs relacionados con ScPmt1, ScPmt2 y ScPmt4 en todo el reino animal, con la excepción de *Caenorhabditis elegans*. Tampoco existen miembros de PMTs en plantas y protozoos, pero sí se encuentran en algunas bacterias (Willer *et al.*, 2003; Cruces, *datos sin publicar*).

En eucariotas superiores, Martín-Blanco y García-Bellido describieron por primera vez la existencia de una posible Proteína O-manosil transferasa en *D. melanogaster*, codificada por el gen *rotated abdomen*, *rt*. Mutaciones en este gen afectan al desarrollo del músculo de la larva y producen defectos en la arquitectura muscular de la mosca adulta, que se manifiesta con un fenotipo de abdomen girado. Los individuos *rt* son poco viables (Martin-Blanco and Garcia-Bellido, 1996).

Más tarde, nuestro grupo caracterizó en humanos el gen ortólogo de *rt*, al que se denominó *POMT1* (Proteína O-manosil transferasa 1), que codificaba una posible O-manosiltransferasa, ya que presentaba homología con las PMTs de levaduras y con *rt* (Jurado *et al.*, 1999).

Basándose en el fenotipo de defecto muscular observado en las moscas *rt*, y en la posible función O-manosiltransferasa de *POMT1*, nuestro grupo pensó que *POMT1* podría manosilar alguna proteína implicada en el desarrollo muscular de mamíferos, como el α -dístroglicano, y que podría ser entonces responsable de alguna distrofia muscular hereditaria o miopatía congénita. Reforzaban esta hipótesis los datos concernientes al α -dístroglicano, única proteína descrita en mamíferos que contenía gran cantidad de O-manosilglicanos (Chiba *et al.*, 1997), y formaba parte del complejo glicoproteico de distrofina de células musculares y neuronales (Henry and Campbell, 1999). El hecho de que no hubiese mutaciones descritas en el dístroglicano relacionadas con distrofias musculares nos hizo pensar que alguna enfermedad muscular o neuromuscular hereditaria, de la que no se conocía el gen responsable, podría estar causada por mutaciones en *POMT1*. Estas mutaciones provocarían defectos en la O-manosilación del α -dístroglicano, impidiendo la formación de las cadenas Sia α 2-3Gal β 1-4NAcGlc1-2Man-Ser/Thr. Este tetrasacárido está implicado en la unión con laminina en la matriz extracelular de músculo y neuronas (Chiba *et al.*, 1997; Sasaki *et al.*, 1998), con lo que se perdía este nexo.

El gen fue posicionado en el genoma con la esperanza de ser localizado en una región relacionada con alguna enfermedad. *POMT1* se localizó en la

banda cromosómica 9q34.1. En esa misma zona se había posicionado el síndrome de contractura letal congénita (LCCS). Esta enfermedad quedaba excluida puesto que se posicionó a unas 100 kb del marcador vecino D9S61 (Makela-Bengs *et al.*, 1998), indicando que estaba fuera de la región donde se posicionó *POMT1* (Jurado *et al.*, 1999).

El grupo planteó la posibilidad de identificar familias con distrofias musculares con afectación neuronal que aún no estaban ligadas a ninguna región cromosómica para analizar si existía o no ligamiento en la región donde estaba posicionado *POMT1*. Ya entonces sospechábamos que *POMT1* pudiera estar relacionado con WWS, puesto que aún no se había posicionado en el genoma. Mientras tanto, se planteó la generación de un ratón *knockout* para determinar si el fenotipo resultante podría relacionarse o no con alguna distrofia neuromuscular.

El modelo topológico propuesto para la proteína *POMT1* humana está basado en el de la *ScPmt1* de levadura (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999), según el cual *POMT1* es una proteína integral de membrana de R.E. con siete dominios transmembrana (Fig. 2). Su extremo N-terminal se encuentra en el citoplasma, mientras el C-terminal está localizado hacia el lumen del R.E. En la zona luminal hay dos lazos ("loops") hidrofílicos, uno situado entre la transmembrana I y II ("loop" 1), y otro entre las transmembranas V y VI ("loop" 5). En levaduras, estos dos "loops" parecen ser esenciales para la actividad de *ScPmt1* (Girrbach *et al.*, 2000). En el "loop" 5 existen residuos de aa muy conservados, que parecen estar implicados en el reconocimiento y/o unión de las proteínas sustrato, así como en la actividad catalítica de transferencia de ligando. Estudios de comparación de las PMTs con otros organis-

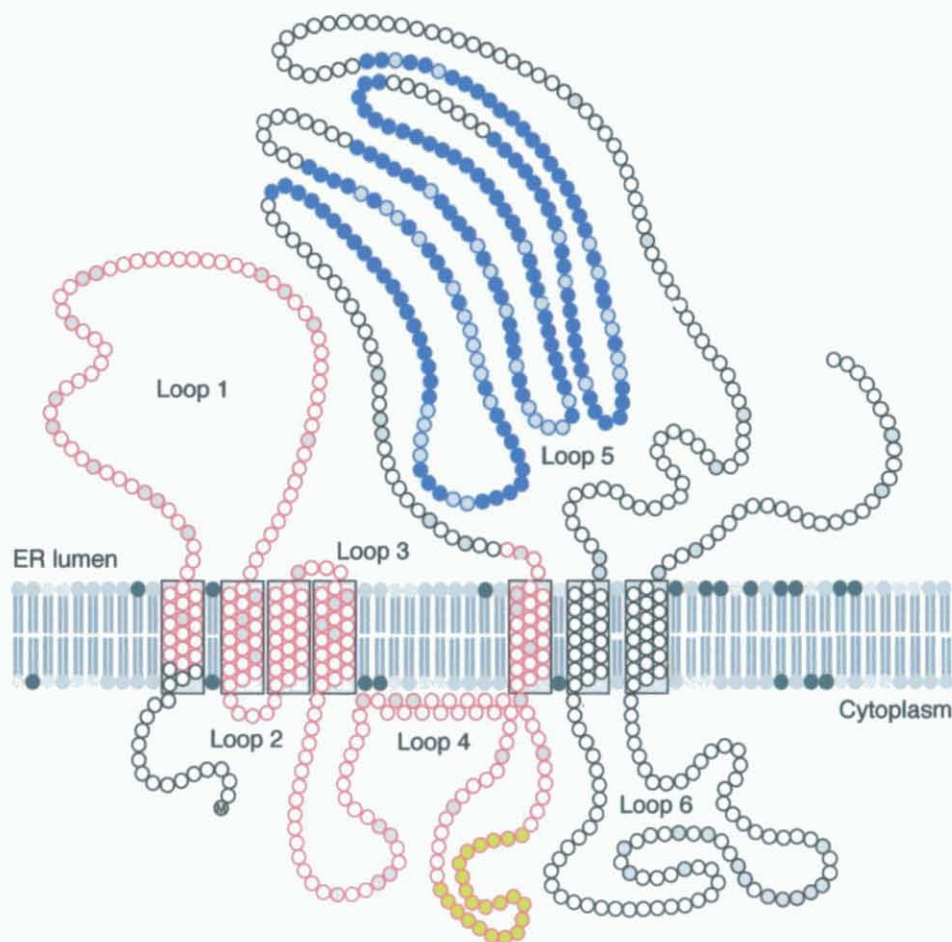


Figura 2. Representación esquemática del modelo topológico propuesto para *POMT1* por analogía con el modelo de *ScPmt1* (Strahl-Bolsinger and Scheinost, 1999). El dominio PMT está representado en rojo. Los dominios MIR se indican en azul. Los aminoácidos conservados se indican en gris.

mos muestran en el “loop” 5 de la ScPmt1 unos dominios peptídicos muy conservados (Girrbach *et al.*, 2000).

En el “loop” 5 de POMT1 hay tres dominios de este tipo (Fig. 2). Son los llamados dominios MIR por encontrarse en manosiltransferasas, en receptores de IP3 o en receptores de rianodina. Los receptores IP3 y de rianodina presentan cuatro dominios MIR, que se encuentran en el extremo N-terminal situado hacia la zona citoplasmática. En el receptor de IP3, esta zona tiene afinidad por su ligando, aunque en el receptor de rianodina no se conoce este tipo de afinidad (Ponting, 2000). Estos dominios MIR también se encuentran en los factores derivados del estroma 2 (SDF2) y en proteínas parecidas a estos factores (SDF2L) (Hamada *et al.*, 1996; Fukuda *et al.*, 2001). Las SDF son proteínas solubles de R.E., y las proteínas SDF2L se han localizado formando parte de complejos multiproteicos de chaperonas y enzimas de plegamiento en el R.E. (Meunier *et al.*, 2002). Si la función de los dominios MIR de estas proteínas tiene algo que ver con la de los dominios MIR de POMT1 está por determinar.

Desde la caracterización del gen *POMT1*, se han ido clonando más genes por su homología con las PMTs, como los miembros de la subfamilia PMT2 en humano (*POMT2*), ratón (*mPom2*) o mosca (*dmPOMT2*) (Willer *et al.*, 2002).

Los miembros de la subfamilia PMT1 en levadura (ScPmt1p y ScPmt5p) actúan en pares formando heterocomplejos con los miembros de la subfamilia PMT2 (ScPmt2 y ScPmt2), mientras que el único miembro de la subfamilia PMT4 (ScPmt4) actúa formando homodímeros (Girrbach and Strahl, 2003). Tanto *rt* (*dmPOMT1*) como *POMT1* pertenecen por homología a la subfamilia de las PMT4. Este tipo de asociación podría ocurrir también entre las POMT humanas, aunque en levaduras no parecen encontrarse asociaciones entre miembros de PMT4 con PMT2 y en humanos no existen más homólogos de PMTs que POMT1 y POMT2, ya que a partir de eucariotes superiores solo se encuentran homólogos de PMT2 y PMT4 (Cruces, *datos sin publicar*).

En cuanto a la actividad enzimática, el grupo de la Dra. Sabine Strahl de Regensburg (Alemania), con el que manteníamos una colaboración, había intentado sin éxito medir la actividad manosiltransferasa de POMT2, con variaciones de los métodos utilizados en levaduras. El resultado negativo se pensó que era debido a que la experimentación se realizó *in vitro*, puesto que en levaduras, los experimentos con que se había conseguido medir actividad se habían realizado *in vivo* (Willer *et al.*, 2002).

Hoy se sabe que POMT1 y POMT2 catalizan la transferencia de O-manosa a residuos de Ser/Thr de proteínas a partir de dolicol-fosfato-manosa. El método desarrollado por el grupo del Dr. Tamao Endo en células de mamífero, empleando un detergente diferente al utilizado en levaduras, ha demostrado que es necesaria la coexpresión de POMT1 y POMT2 para conferir la máxima actividad manosiltransferasa (Manya *et al.*, 2004). Este grupo, utilizando el mismo método en células de insecto, ha demostrado recientemente la actividad O-manosiltransferasa de las proteínas de *D. melanogaster* *dmPOMT1* y *dmPOMT2*. Del mismo modo que en humanos, se requiere la cooperación de ambas POMT para conferir la máxima actividad enzimática (Ichimiya *et al.*, 2004).

4. EL DISTROGLICANO EN EL COMPLEJO GLICOPROTEICO DE DISTROFINA

El distroglicano fue aislado por primera vez como parte integrante del complejo glicoproteico de distrofina (DGC) de membranas de músculo esquelético (Ervasti and Campbell, 1991). Este complejo está compuesto por proteínas de membrana, citosólicas y proteínas extracelulares. Los componentes más conocidos del DGC incluyen distrofina, sarcoglicanos, distroglicano, distrobrevinas, sintrofinas, sarcospan, caveolina-3 y NO sintasa (Fig. 3). La función exacta de todo el DGC no está determinada por completo, pero se piensa que proporciona fuerza y mantiene la estabilidad estructural de la membrana de las células musculares durante la contracción y relajación, y que participa en mecanismos de trans-

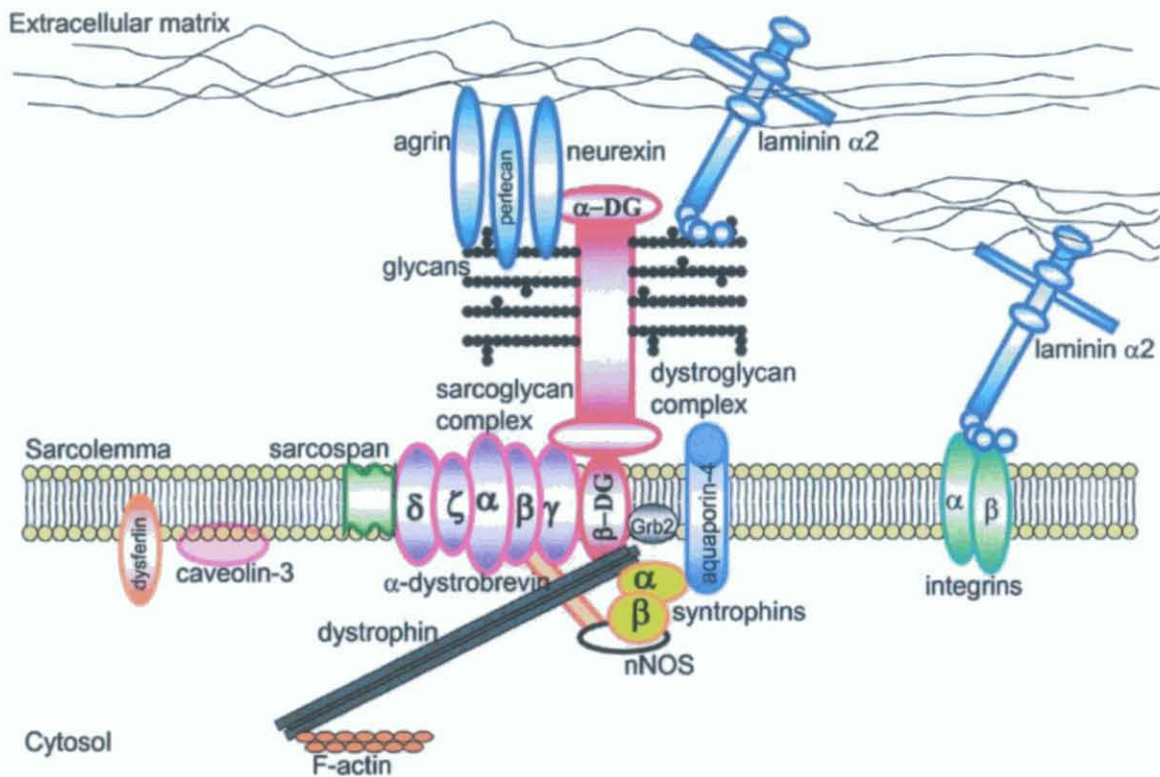


Figura 3. (Cohn, 2005. *Neuromuscular disorders*). Complejo glicoproteico de distrofina. Componentes integrales y periféricos. Proteínas asociadas y proteínas de unión en el músculo esquelético.

ducción de señales (Sciandra *et al.*, 2003; Lapidus *et al.*, 2004).

El distroglicano ocupa la parte central del DGC actuando como nexo de unión entre los componentes de la matriz extracelular y las proteínas del citoesqueleto. La proteína proviene de un solo gen, y es procesada sufriendo un corte proteolítico para dar lugar a dos subunidades: una periférica, o α -distroglicano, y otra integral de membrana, o β -distroglicano (Ibraghimov-Beskronnaya *et al.*, 1992). Se expresa en todos los tejidos musculares y en multitud de tejidos no musculares, incluyendo epitelios, sistema nervioso central y periférico (Durbeej *et al.*, 1998).

En el sarcolemma, el β -distroglicano se une intracelularmente a la distrofina, la cual se une a proteínas del citoesqueleto. Extracelularmente se une al α -distroglicano, que a su vez se une a proteínas de la lámina basal en la matriz extracelular como laminina, neurexina, agrina y perlecano. El β -distroglicano también se une al complejo de sarcoglicanos (α , β , γ , δ , ζ), y a la caveolina-3 (Michele and Campbell, 2003; Cohn, 2005).

Se han identificado muchas distrofias musculares causadas por mutaciones en diversos componentes del DGC, tanto proteínas de la matriz extracelular, como del sarcolemma, del citoesqueleto, del citosol e incluso proteínas nucleares. La distrofia muscular de Duchenne o de Becker (DMD, DMB) están causada por mutaciones en el gen de la *distrofina*. Mutaciones en los genes de los sarcoglicanos y en otros genes del citoesqueleto o el sarcolemma, producen distrofias musculares de cintura (LGDM) de diversa severidad clínica. (Cohn and Campbell, 2000; Sciandra *et al.*, 2003). Otro grupo muy heterogéneo de enfermedades relacionadas con el DGC son las distrofias musculares congénitas (CMD), que se manifiestan clínicamente desde el nacimiento y frecuentemente conducen a la muerte durante la niñez. Están relacionadas con mutaciones en genes del sarcolemma, como las integrinas; de la matriz extracelular, como el colágeno tipo VI; o de la lámina basal, como laminina $\alpha 2$. Otras formas más graves de CMDs se han relacionado recientemente con anomalías en la glicosilación del distroglicano (Muntoni *et*

al., 2002; Nishino and Ozawa, 2002; Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2005).

Existen modelos animales para cada uno de los componentes del DGC. Algunos de estos animales presentan mutaciones que ocurren de manera natural, y otros han sido generados por ingeniería genética. Aunque ninguno refleja totalmente las distrofias musculares humanas, son una herramienta muy válida para entender el mecanismo de la enfermedad e incluso para el desarrollo de terapias para distrofias musculares (Durbéej and Campbell, 2002).

5. O-MANOSILACIÓN Y ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES: “DISTROGLICANOPATÍAS”

En los últimos años ha habido un “boom” en la identificación de distintas enfermedades neuromusculares causadas por genes implicados en la O-glicosilación del α -dístroglicano. Con la identificación de determinadas enzimas glicosiltransferasas o posibles glicosiltransferasas se ha propuesto un nuevo mecanismo de desarrollo de distrofias musculares congénitas con afectación neuronal. Recientemente se han denominado “dístroglicanopatías”, si bien el defecto no recae en la proteína del dístroglicano como tal, sino en la glicosilación de la misma. Algunas de estas proteínas participan directamente en la formación de las cadenas de los O-manosilglicanos del α -dístroglicano $\text{Si}\alpha\text{2-3Ga}\beta\text{1-4NAcGl c1-2Man-Ser/Thr}$, que parecen estar implicados en la unión a ligando en células musculares y en neuronas (Endo, 2004; Haliloglu and Topaloglu, 2004; Muntoni and Voit, 2004; Cohn, 2005).

Las enfermedades neuromusculares, o CMDs que presentan malformaciones cerebrales y oculares de diversa gravedad, son el síndrome de Walker-Warburg (WWS, MIM 236670), la enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB, MIM 253280), y la CMD de Fukuyama (FCMD, MIM 253800). Otros dos tipos de CMDs de menor severidad, con o sin afectación neuronal, son la CMD de tipo 1C (MDC1C, MIM 606612), y la CMD de tipo 1D (MDC1D). Los genes

responsables de estas enfermedades son *POMT1*, *POMGnT1*, *fukutina*, *FKRP* y *LARGE* respectivamente, aunque por el momento, únicamente *POMT1* y *POMGnT1* muestran actividad enzimática de glicosiltransferasa. El resto son posibles glicosiltransferasas (Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2005).

Las menos graves son MDC1C y MDC1D, que han sido descritas recientemente como nuevos tipos de CMD con deficiencia secundaria de merosina y deficiencia en la glicosilación del α -dístroglicano. MDC1D está causada por mutaciones en el gen *LARGE*, y presenta en casos aislados retraso mental y defectos leves de la migración neuronal (Longman *et al.*, 2003). MDC1C está causada por mutaciones en el gen *FKRP*, y es también un tipo de CMD con deficiencia secundaria de merosina sin aparentes malformaciones cerebrales (Brockington *et al.*, 2001a), aunque se han encontrado casos con mutaciones que provocan ciertas anomalías estructurales en el cerebro que permiten clasificarla dentro de las CMD con afectación neuronal (Topaloglu *et al.*, 2003). Una variante alélica más leve de MDC1C causada también por mutaciones en el gen *FKRP*, fue localizada en la misma región cromosómica 19q13.3: la distrofia muscular de cintura de tipo 2I (LGMD2I) (Brockington *et al.*, 2001b).

El grupo de CMDs con mayor afectación lo constituyen FCMD, MEB y WWS. Las tres presentan malformaciones cerebrales, aunque se manifiestan de forma más leve en FCMD y más grave en WWS. Entre las malformaciones se incluye el llamado “cobblestone complex” o lisencefalia de tipo II, producida por defectos en la migración neuronal que dan lugar a un cortex desorganizado y de espesor variable en los hemisferios cerebrales y el cerebelo. Otras características comunes incluyen dilatación de los ventrículos laterales, tallo cerebral plano e hipoplasia cerebelar (Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2005; van Reeuwijk *et al.*, 2005a).

La CMD de Fukuyama es la forma más suave de las tres, y se conoce desde hace tiempo. Es un tipo de CMD endémica de Japón que cursa con CMD acompañada de retraso mental severo, anomalías

cerebrales estructurales y en algún caso oculares. La esperanza de vida es de 10 a 20 años. La forma más común de esta CMD se produce por la inserción de un retrotransposón ancestral de 3 kb en la zona 3' no traducida del gen de la *fukutina* (Kobayashi *et al.*, 1998). Aunque no se ha demostrado aún su actividad enzimática, el hecho de que el α -dístroglicano esté hipoglicosilado en pacientes con FCMD aporta una prueba indirecta de que la *fukutina* participa en la glicosilación del α -dístroglicano (Hayashi *et al.*, 2001).

La enfermedad de músculo-ojo-cerebro (MEB) y el síndrome de Walker-Warburg también se conocen desde hace tiempo. Los individuos afectados con MEB presentan desde la infancia CMD severa y problemas visuales que incluyen miopía, glaucoma e hipoplasia retinal. Presentan retraso mental severo y anomalías cerebrales incluida lisencefalia de tipo II. La esperanza de vida en estos pacientes es de hasta 20 años. Las características clínicas de WWS y MEB han inducido a error a la hora del diagnóstico durante mucho tiempo y se pensaba que podrían ser alélicas. Se sabía que el gen causante de MEB estaba localizado en el cromosoma 1p32-34, aunque la localización del gen responsable de WWS no se conocía. El grupo del Dr. Lehesjoki analizó el ligamiento genético de varias familias (diagnosticadas clínicamente como MEB o WWS indistintamente), con la zona 1p32-34, permitiendo establecer un diagnóstico genético para MEB (Cormand *et al.*, 2001). Más tarde, el grupo del Dr. Tamao Endo identificó varias mutaciones en distintos pacientes con MEB, y el gen responsable resultó ser una glicosiltransferasa que participa en la síntesis de O-manosilglicanos, *POMGnT1* (Yoshida *et al.*, 2001). Hoy se sabe que la mutación más común entre estos enfermos afecta a un sitio de splicing en el exón 17 del gen *POMGnT1* (Diesen *et al.*, 2004).

El síndrome de Walker-Warburg es el más grave de los mencionados aquí en cuanto al fenotipo cerebral se refiere, ya que puede diagnosticarse incluso prenatalmente. Los individuos afectados presentan lisencefalia tipo II con agenesia del cuerpo

calloso, hidrocefalia, ausencia del septum y de la vermis cerebelar, agyria completa, fusión de los hemisferios cerebrales, dilatación del cuarto ventrículo y en ocasiones encefalocele occipital. Los pacientes con WWS suelen morir durante los primeros meses de vida, llegando a alcanzar los 3 años de edad en algún caso.

Ya antes de que se identificase *POMGnT1* como causante de MEB, nuestro grupo había propuesto a *POMT1* como causante de WWS. Sin embargo, ante la carencia de enfermos WWS en ese momento en España, se sugirió al grupo del Dr. Han Brunner el análisis del ligamiento con la zona donde se localizaba *POMT1* en familias WWS, de las que este grupo poseía muestras, procedentes de un Consorcio Internacional. El Dr. Brunner analizó el ligamiento con la zona donde se localizaba *POMT1*, 9q34, en 30 pacientes diagnosticados como WWS (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002). Encontraron ligamiento en 5 de 15 familias analizadas e identificaron mutaciones de *POMT1* al menos en el 20% de los casos analizados, lo cual indicaba que esta enfermedad debía ser muy heterogénea. Adicionalmente, y por homología con *POMT1*, analizaron ligamiento de la enfermedad con la zona donde se localizaba el gen *POMT2*, 14q24, y secuenciaron el gen en los individuos enfermos que no presentaban mutaciones en *POMT1* sin obtener éxito.

En los últimos tres años se han ido identificando casos adicionales de WWS que presentaban mutaciones en otros genes (Fig.4). Mutaciones en homóloigos "nonsense" han sido halladas en el gen de la *fukutina* en dos casos individuales de pacientes con síntomas típicos de WWS (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2003; Silan *et al.*, 2003).

Asimismo, se han encontrado mutaciones "missense" en el gen *FKRP* en dos individuos con características típicas de WWS y MEB (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2004). Los pacientes ya habían sido incluidos en una revisión clínica de MEB y WWS realizada por Cormand *et al.* (2001). El paciente diagnosticado con MEB no había mostrado ligamiento al locus de *POMGnT1* ni presentaba mutaciones en es-

<i>POMT1</i>						++
<i>POMGnT1</i>				+	++	+
<i>Fukutin</i>			++			+
<i>FKRP</i>	++	++	+		+	+
<i>LARGE</i>			+	*	*	*
	LGMD2I	MDC1C	MDC1D	FCMD	MEB	WWS

Clinical severity →

Figura 4. (van Reeuwijk *et al.*, 2005. *Clinical Genetics*). Correlación entre genotipo-fenotipo en las “dístroglicanopatías”. Las mutaciones en los genes que producen las distintas enfermedades se designan con + (si es raro) y ++ (si es más frecuente). El asterisco representa el fenotipo del ratón *myd* con mutaciones en *Large*, que concordaría con fenotipos de FCMD y/o MEB de diversa gravedad. Las mutaciones en *POMGnT1* se han encontrado en pacientes diagnosticados como WWS suave o FCMD grave, según sus características fenotípicas.

te gen. El paciente diagnosticado con WWS no había mostrado ligamiento al locus de *POMT1*, aunque sí al locus de *POMGnT1*, pero no presentaba mutaciones en *POMGnT1* ni en *POMT1*.

El hallazgo más reciente en la identificación de nuevas mutaciones causantes de WWS implica por fin a *POMT2*, puesto que hasta ahora no se habían encontrado mutaciones en este gen, a pesar de que *POMT1* parece requerir la ayuda de *POMT2* a la hora de ejercer su actividad enzimática. Se ha localizado homocigosidad en el locus de *POMT2* (14q24) en 6 de 17 familias consanguíneas diagnosticadas con WWS, y se han encontrado mutaciones en homocigosis en el gen *POMT2* en tres de ellas (van Reeuwijk *et al.*, 2005b).

Hasta el momento, hay cuatro genes causantes de WWS, que entre todos los casos identificados no representan más de un tercio de los casos totales estudiados. Esto sugiere que hay muchos otros genes implicados en el desarrollo de esta enfermedad que aún no se han identificado, y que podrían estar implicados en la glicosilación del α -dístroglicano. Entre ellos, podrían encontrarse los genes de la Galactosil transferasa o la Sialil transferasa encargadas de añadir residuos de galactosa o ácido siálico en los O-manosilglicanos (Sia α 2-3Gal β 1-4NAcGlc1-2Man-Ser/Thr) del α -dístroglicano (van Reeuwijk *et al.*, 2005a).

Estos datos, sumados al hecho de que un mismo gen (*FKRP*) sea responsable de un amplio rango de “dístroglicanopatías”, que comprende desde las formas más leves hasta las más graves (LGMD2I, MDC1C, MEB o WWS) (Fig. 4), han hecho pensar a varios autores en la posibilidad de que aunque todas estas enfermedades se han ido definiendo como entidades clínicas individuales, puedan representar una misma entidad con un espectro variable de fenotipos, que venga determinado por la mutación específica en cada uno de los genes afectados (Cohn, 2005; Jimenez-Mallebrera *et al.*, 2005; van Reeuwijk *et al.*, 2005b).

Por último, cabe destacar aquí todo el trabajo realizado en torno al dístroglicano fuera del ámbito de las enfermedades neuromusculares. Durante mucho tiempo el interés del dístroglicano ha estado limitado a su estudio en el músculo esquelético y su relación con distrofias musculares. El dístroglicano está distribuido por una gran variedad de tejidos entre la célula y la membrana basal de la matriz extracelular. Juega un importante papel en la maduración de elementos postsinápticos en el sistema nervioso periférico, en el reconocimiento de ciertos arnavirus patógenos que infectan células humanas, en la organización del citoesqueleto y de las membranas basales, y en la polarización celular y el

crecimiento en células epiteliales. Finalmente, también se le ha relacionado con cáncer en humanos, donde el incorrecto procesamiento del distroglicano podría ejercer un papel en el desarrollo de cáncer epitelial al alterarse las interacciones entre las membranas basales y las células del citoesqueleto, lo que favorecería el desarrollo de tumores y la invasividad. Todos esos trabajos han sido revisados por Sgambato and Brancaccio (2005). Esta implicación en cáncer no parece deberse a un defecto de glicosilación del distroglicano, sino a la falta de expresión de éste en la membrana. Podría darse un nuevo enfoque al estudio de las proteínas que modifican al distroglicano en este campo, ya que al fin y al cabo, el efecto de una pérdida de conexión con la matriz extracelular sería el mismo.

En el presente trabajo, hemos identificado nuevas proteínas que parecen interaccionar con POMT1 y con POMT2, que podrían participar en el plegamiento o ser nuevas dianas de manosiación de POMTs, y que proponemos como nuevos candidatos para la búsqueda de mutaciones en enfermos con “distroglicanopatías”.

Con la caracterización del gen *Pomt1* en el ratón, hemos visto que su expresión durante el desarrollo embrionario está principalmente localizada en las zonas más afectadas en pacientes con WWS.

La expresión de *Pomt1* junto con *Pomt2* en tejidos adultos como el músculo esquelético, el corazón y el testículo refuerzan la hipótesis de que ambas proteí-

nas actúan conjuntamente. Más aún, la localización de *Pomt1* en el acrosoma de las células germinales masculinas en fase de maduración sugiere una posible implicación de *Pomt1* y *Pomt2* en fertilización.

La interrupción alélica de *Pomt1* en el ratón ha resultado ser letal durante la embriogénesis debido a defectos en el ensamblaje de la membrana de Reichert. Dado que esta membrana es específica de roedores, es probable que todos los modelos *knockout* de las proteínas implicadas en la glicosilación del distroglicano resulten igualmente letales. Con la intención de evitar esta barrera de letalidad hemos generado ratones quimera utilizando células ES mutadas en ambos alelos, aunque por el momento no hemos conseguido quimeras que muestren un fenotipo notable. Paralelamente, estamos generando un ratón *knockout* condicional que nos permita eliminar el gen *Pomt1* en diferentes tejidos.

Nuestro trabajo demuestra que los O-manosilglicanos no solo están implicados en el desarrollo de enfermedades neuromusculares, sino en procesos críticos para el correcto desarrollo embrionario, como la formación de membranas basales tempranas. En el adulto, a parte de mantener la integridad estructural en las membranas de las células musculares, probablemente estén implicados en fertilización. El ratón condicional de *Pomt1* en testículo nos proporcionará información adicional del papel que juegan los O-manosilglicanos o más directamente *Pomt1* en fertilidad.

OBJETIVOS

Desde hace años, nuestro grupo está interesado en el estudio de la Proteína O-manosil transferasa 1 (POMT1) y su posible implicación en patologías neuromusculares. Aunque se han realizado algunos ensayos con POMT1 humano, el objetivo principal de esta tesis se ha centrado en el estudio de *Pomt1* en el ratón, así como en la obtención de animales *knockout* de *Pomt1*, que permitan estudiar su función. Los objetivos concretos de esta tesis han sido los siguientes:

1. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN PROTEÍNA-PROTEÍNA MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

- Determinar si las proteínas que interaccionan con POMT1 lo hacen con POMT2.
- Determinar si POMT1 forma homo o heterocomplejos con POMT2, o interacciona con el α -dystroglicano, proteína diana de manosilación.

2. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DE *POMT1* EN EL RATÓN

- Establecer el patrón de expresión del RNA de *Pomt1* durante el desarrollo embrionario y en el adulto.
- Determinar mediante inmunodetección los tejidos donde se expresa la proteína *Pomt1* y su localización en los mismos.

3. GENERACIÓN DEL RATÓN *KNOCKOUT* PARA EL GEN *Pomt1*

- Obtención de ratones homocigotos para la interrupción del gen *Pomt1* mediante recombinación homóloga en células ES, que permitan estudiar cómo afecta el déficit de O-manosilación en el ratón.

4. GENERACIÓN DE RATONES QUIMERA BASADOS EN EL USO DE CÉLULAS ES^{*Pomt1*^{-/-}}

- Obtención de ratones quimera a partir de células ES^{*Pomt1*^{-/-}}, mediante recombinación homóloga en células ES^{*Pomt1*^{+/-}}.
- Estudios del fenotipo de las distintas quimeras.
- Determinación del grado de quimerismo y estudios que indiquen cómo afecta la ausencia de *Pomt1* en los principales tejidos, dependiendo del porcentaje de células ES^{*Pomt1*^{-/-}} que hayan contribuido al desarrollo de los mismos.

5. GENERACIÓN DE UN RATÓN *KNOCKOUT* CONDICIONAL PARA EL GEN *Pomt1* MEDIANTE EL SISTEMA CRE-Lox-P

- Obtención de un ratón homocigoto *Pomt1*^{*loxP/loxP*} que permita la interrupción génica de *Pomt1*, utilizando ratones transgénicos que expresen CRE bajo el control de un promotor inducible o específico de tejido.

MATERIALES y MÉTODOS

Todos los reactivos empleados en la preparación de las distintas soluciones y tampones han sido de grado analítico o de grado apto para su uso en biología molecular. La composición de dichas soluciones o tampones se indica a lo largo del texto.

Las técnicas básicas de biología molecular, como el clonaje de genes heterólogos y transformación en bacterias, electroforesis de ácidos nucleicos, así como las técnicas de transferencia y detección de ácidos nucleicos (*Southern Blot* o *Northern Blot*) se realizaron según los protocolos que describen Sambrook y Russell (2001).

1. CEPAS BACTERIANAS

Para todos los clonajes de genes heterólogos en bacterias, se utilizó la cepa DH5- α de la especie de *E. coli*.

DH5- α . *supE44*, Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15), *hsdR17*, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1*.

2. CEPAS DE LEVADURA

Para los ensayos de doble híbrido se utilizó una cepa de *S. cerevisiae* del kit *MATCHMAKER Two-Hybrid System 3* (Clontech Laboratories)

PJ692A. *MATa*, *trp1-901*, *leu2-3, 112*, *ura3-52*, *his3-200*, *gal4D*, *gal 80D*, *LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS3*, *GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2*

3. LÍNEAS CELULARES Y CEPAS DE RATÓN

El ratón que se ha usado en la generación de animales modificados genéticamente pertenece a la especie *M. musculus*. Todos los ratones fueron tratados de acuerdo con las normas y criterios que establece el Real Decreto 223/1988 de 14 marzo del Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. BOE 18 marzo 1988, núm. 67 [pág. 8509].

3.1. Líneas celulares embrionarias pluripotentes de ratón

E14.1: derivadas de la cepa 129P2/Ola, color chinchilla con ojos rosas (Hooper *et al.*, 1987).

3.2. Cepas de ratón

Los ratones con los que hemos trabajado provienen de la cepa BALB/c y 129P2/Ola.

4. VECTORES DE CLONAJE

4.1. Vectores de expresión en levadura

Los vectores utilizados para generar construcciones para el ensayo de doble híbrido en levadura, así como los vectores control, provienen del kit *MATCHMAKER Two-Hybrid System 3* (Clontech Laboratories).

pGBKT7. Gal4-BD (TRP) (Kan^r)

pGADT7. Gal4-AD (LEU) (Amp^r)

pACT2. Gal4-AD (LEU) (Amp^r)

pGBKT7-p53 + pGADT7-AgT. (Control positivo de interacción)

pGBKT7-Lam (Lamin C) + pGADT7-AgT. (Control negativo de interacción)

4.2. Vectores utilizados en la generación de ratones modificados genéticamente.

pPNT. Vector utilizado para la construcción del ratón *knockout*, las quimeras ES^{Pom1-/-}, y el ratón *knockout* condicional (Tybulewicz *et al.*, 1991).

pSL301. Vector utilizado para subclonaje de fragmentos para la construcción final del *knockout* condicional (Invitrogen).

pBABE-puro. Vector utilizado en la generación de quimeras ES^{Pom1-/-}. Contiene el gen de resistencia a puromicina (*puro*) bajo el control del promotor de SV40 (Morgenstern and Land, 1990).

5. OLIGONUCLEÓTIDOS

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron diseñados con la ayuda del programa informático Oligo 6.8 (MacOsX), y fueron sintetizados por Isogen o Invitrogen indistintamente.

5.1. Oligonucleótidos utilizados en los clonajes de ensayos en levadura

Las dianas de restricción aparecen subrayadas.

5.1.1. Cebadores para construcciones en el vector pGBKT7 o pGADT7

NOMBRE	SECUENCIA
Loop1-POMT1- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCGGAGGAGGAGGAGGACCGCGAGCTGTGGTTTTTGAC-3'
Loop1-POMT1- <i>Bam</i> HI (R)	5'-CGGGATCCACACAGGCACGTTGCTACTG-3'
Loop5-POMT1- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCGGAGGAGGAGGAGGATTGATTCTAGTCTCCGCTCTG-3'
Loop5-POMT1- <i>Eco</i> RI (R)	5'-CGGAATTCATGTTACCAAGTAGGTGGATCTG-3'
Loop1-POMT2- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCAGTTACTATATCAACC-3'
Loop1-POMT2- <i>Eco</i> RI (R)	5'-GCGAATTCAGTGCTGCTGAGAGG-3'
Loop5-POMT2- <i>Bam</i> HI (D)	5'-GCGGATCCAGGCACGGCTTTCAGG-3'
Loop5-POMT2- <i>Bam</i> HI (R)	5'-CGGGATCCTGCAACCTCTGCTGGC-3'

5.1.2. Cebadores para ensayos de interacción entre POMT1 y distroglicano

NOMBRE	SECUENCIA
DYS-A- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCATGAGGATGTCTGTGG-3'
DYS-AB- <i>Clal</i> (R)	5'-GGATCGATTTAAGGTGGGACATAG-3'
DYS-A- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCATGAGGATGTCTGTGG-3'
DYS-A- <i>Clal</i> (R)	5'-CCATCGATCCCGGGTGATATTCT-3'
DYS-A- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCATGAGGATGTCTGTGG-3'
DYS-A-(N-t)- <i>Xho</i> I (R)	5'-GGCTCGAGATGGATCTGCCTCCGG-3'
DYS-A mucina- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCGCTACACCCACACCTG-3'
DYS-A mucina- <i>Sad</i> (R)	5'-CGGAGCTCGTGGTGGTGCAATAC-3'
DYS-A-(C-t)- <i>Eco</i> RI (D)	5'-CGGAATTCAGTGGAGTGCCCCGTG-3'
DYS-A- <i>Clal</i> (R)	5'-CCATCGATCCCGGGTGATATTCT-3'
DYS-B- <i>Eco</i> RI (D)	5'-GGAATTCCTCAATCGTGGTGAATG-3'
DYS-B- <i>Xho</i> I (R)	5'-GGCTCGAGTTAAGGTGGGACATAG-3'

5.2. Oligonucleótidos utilizados en la generación de animales modificados genéticamente y en el genotipado de ratones

Los cebadores utilizados en los distintos clonajes y para el rastreo de clones recombinantes se han designado con letras y números respectivamente. Las dianas de restricción aparecen subrayadas y los elementos loxP en cursiva.

NOMBRE	SECUENCIA
a: m3'-(UHG)- <i>KpnI</i> (D)	5'-GGGGTACCAGAATACCTTAGGGAGCG-3'
b: ml1-Pomt1- <i>XbaI</i> (R)	5'-GCTCTAGATTGCTTGTGCCCCGAGC-3'
c: ml4-Pomt1- <i>EcoRI</i> (D)	5'-GGAATTCAGGGACCCTCTGGTT-3'
d: ml9-Pomt1- <i>XhoI</i> (R)	5'-AAAGACTCGAGATGGAGCCCTA-3'
e: loxP-neo- <i>XbaI</i> - <i>HindIII</i> (D)	5'-GCTCTAGAAAGCTTATACTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATGGCCCCTGCAGGTCAATTCTAC-3'
f: loxP-neo- <i>XbaI</i> (R)	5'-GGCTCTAGAATAAATTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGTACCCGGGGATCCACTAGAGTC-3'
g: ml9-Pomt1- <i>SalI</i> (D)	5'-ACGCGTCGACACTTTGTTTTAGTAACCA-3'
h: ml13-Pomt1- <i>NotI</i> (R)	5'-ATAAGAAAGCGGCCGAGAACCCAGAACCTGTCAGC-3'
i: ml11-Pomt1-loxP- <i>BamHI</i> - <i>HindIII</i> (D)	5'-CGGGATCCAAGCTTATACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAGTTATGGCGGTGAGTGTGGTTTCCTCAG-3'
j: ml12-Pomt1- <i>KpnI</i> (R)	5'-GGTGACCTTAGGTACCCAGCAGTAAAGAGAGTG-3'
1: m3'b-(UHG) (D)	5'-ACATGCTTTCTCAGGCTGTGTC-3'
2: 126 Neo (D)	5'-TCTCAGTATTGTTTGCCAAGTTC-3'
3: mPr-Pomt1 (D)	5'-GGGAGCCACTCTACGGGACT-3'
4: ml1c-Pomt1 (R)	5'-GGCGTCACGATGAATTACAG-3'
5: 125 Neo b (D)	5'-CAGCTCATTCCTCCCACTCAT-3'
6: Puro 2 (D)	5'-CCCCGCAACCTCCCCTTCTAC-3'
7: mAKOc (D)	5'-TGATTTGTTTTCTACCTTG-3'
8: ml6 (R)	5'-GCTAAGGCTC CGCAGTCAGA-3'
9: m6 (D)	5'-ATCACTCAGT CCAGGCTCAT-3'

6. SONDAS UTILIZADAS EN HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A MEMBRANA (Northern Blot Y Southern Blot), E HIBRIDACIÓN *in situ*

6.1. Sondas de cDNA para Northern Blot e hibridación *in situ*.

Pomt1 (449-1193 pb). Fragmento que contiene del exón 5 al 11 de *Pomt1* de ratón.

Pomt2 (659-1727 pb). Fragmento que contiene del exón 5 al exón 15 de *Pomt2* de ratón.

POMT1 (1398-2184 pb). Fragmento que contiene del exón 12 al exón 19 de *POMT1* humano.

Sondas sentido y antisentido de Pomt1 (2051-2610 pb). Contienen del exón 19 hasta parte de la

secuencia 3' no codificante de *Pomt1* de ratón. Utilizadas en hibridación *in situ*.

6.2. Sondas de DNA genómico para Southern Blot.

Sonda KO. Fragmento de 385 pb del intrón 9 de *Pomt1*. Utilizada para rastreo de clones recombinantes en la generación del *knockout* de *Pomt1* y en la generación de quimeras ES^{*Pomt1* -/-}.

Sonda ES. Fragmento de 572 pb que contiene parte del promotor de *Pomt1* hasta el intrón 1. Utilizada para determinar el grado de quimerismo en tejidos de ratones quimera ES^{*Pomt1* -/-}.

Sonda a. Fragmento de 223 pb desde el intrón 3 al intrón 4 de *Pomt1*.

Sonda b. Fragmento de 355 pb desde el intrón 14 al intrón 15 de *Pomt1*. Utilizadas ambas para el rastreo de clones recombinantes en el *knockout* condicional.

7. ANTICUERPOS

7.1. Anticuerpos Primarios

Anti-POMT1 (SP26). Anticuerpo producido en conejo, usando un péptido sintético conjugado a KLH (*Keyhole limpet hemocyanin*), correspondiente a los aminoácidos 510-524 (VEEHRYGASQEQRER) de POMT1. Utilizado en inmunotransferencia (*Western Blot*, WB) (1:1000) e inmunofluorescencia (IF) (1:25) (producido y purificado por la casa comercial Eurogentec).

Anti-POMT2. Usado en IF (1:25). Cedido amablemente por la Dra. Sabine Strahl.

Anti-calnexina. Producido en conejo y utilizado en IF (1:200) (Stressgen).

Anti-laminina. Producido en conejo y utilizado en IF (1:200) (SIGMA).

Anti- α -dístroglicano (VIA-4). Anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona contra residuos glicosídicos del α -dístroglicano WB (1:1.000) e IF (1:100) (Upstate Biotechnologies).

Anti- β -Dístroglicano (β -DG) (43DAG1/8D5). Anticuerpo monoclonal de ratón usado en IF (1:15 o 1:25) (Vector Laboratories).

Anti- β -Dístroglicano (AP83). Producido en conejo y usado en IF (1:50). Cedido amablemente por el Dr. Kevin Campbell (Universidad de Iowa, USA).

Anti- α -dístroglicano (IIH6). Anticuerpo monoclonal de ratón que reacciona contra residuos glicosídicos del α -dístroglicano. Usado en IF (1:200). Cedido amablemente por el Dr. Kevin Campbell.

Anti- α -dístroglicano (GT20ADG). Anticuerpo producido en conejo que reacciona contra la zona proteica del α -dístroglicano. Usado en IF (1:15). Cedido amablemente por el Dr. Kevin Campbell.

7.2. Anticuerpos secundarios

Anti-IgG de conejo acoplado a peroxidasa. Producido en cabra y utilizado en WB (1:10.000) (Nordic).

Anti-IgG de ratón acoplado a peroxidasa. Producido en cabra y utilizado en WB (1:10.000) (Nordic).

Anti-IgG de ratón acoplado a biotina. Producido en caballo y utilizado en IF (1:200) (Vector Laboratories).

Anti-IgG de conejo acoplado a biotina. Producido en cabra y utilizado en IF (1:200) (Vector Laboratories).

Alexa-488. Anti-IgG de conejo producido en cabra y acoplado a un fluorocromo. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

Alexa-594. Anti-IgG de ratón producido en cabra y acoplado a un fluorocromo. Utilizado en IF (1:500) (Molecular Probes).

8. CLONAJE Y TRANSFORMACIÓN EN *E. coli*

Los fragmentos a clonar fueron amplificados por PCR, usando cebadores diseñados con dianas de restricción. Cada amplificación se llevó a cabo con 50-100 ng de DNA, en un volumen final de 25 μ l conteniendo 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 0,2 mM de cada cebador, y 0,625 U de Taq DNA polimerasa termoestable (Ecogen), en un termociclador PTC-100 (*Peltier Thermal Cycler* M. J. Research), siguiendo variaciones del programa: 1 ciclo de 5 min. 94° C; 30 ciclos de (1 min. 94° C, 1 min. 50° C - 65° C, 1 min. 72° C; 1 ciclo de 5 min. 72° C). Las técnicas de clonaje y transformación en *E. coli* fueron llevadas a cabo siguiendo los protocolos de Sambrook y Russell (2001). Los plásmidos clonados fueron purificados con el kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification system* (Promega). Los DNA clonados se secuenciaron en un secuenciador automático *ABI Prism 377* (Perkin Elmer) (Sanger *et al.*, 1977).

9. DOBLE HÍBRIDO DIRIGIDO EN LEVADURAS

Los ensayos de doble híbrido se llevaron a cabo utilizando componentes del kit *MATCHMAKER Two-Hybrid System 3* (Clontech). El ensayo se basó en el método anteriormente descrito (Fields and Song, 1989; Chien *et al.*, 1991; Bartel and Fields, 1995) en el que un gen "cebo" se expresa como proteína de fusión con el

dominio de unión a DNA (“*binding domain*”) del factor de transcripción *GAL4* (*GAL4BD*), mientras otro gen se expresa como proteína de fusión con el dominio de activación (“*activating domain*”) de *GAL4* (*GAL4AD*). Cuando interaccionan ambas proteínas, los dominios BD y AD se aproximan para activar la expresión de los genes reporteros *HIS3* y *ADE2* (Fig. 5).

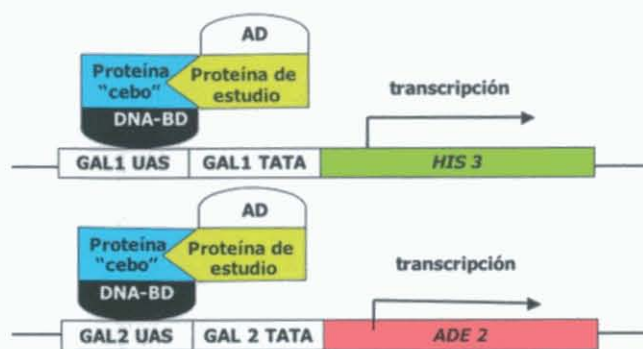


Figura 5. Funcionamiento del sistema de doble híbrido en levadura. Las levaduras donde se realiza el ensayo poseen genes reporteros (*ADE2*, *HIS3*) bajo el control del promotor de *GAL4*. La interacción de las proteínas fusionadas a los dominios de unión o activación de *GAL4* activará los genes reporteros.

9.1. Construcciones utilizadas en los ensayos de doble híbrido dirigido

Los fragmentos de PCR usados en estos clonajes se amplificaron utilizando como molde el cDNA procedente de la retrotranscripción (RT) de una línea de linfoblastos inmortalizados humanos GM-181 (*Coriell Cell Repositories*), y están clonados en pauta con el dominio *Gal4-BD* y *Gal4-AD* respectivamente. Los clonajes se realizaron como se indica en el apartado 8.

9.1.1. Quimeras *GAL4-BD* en el vector *pGBKT7*: “cebos”

Fragmentos amplificados con los cebadores del apartado 5.1.1.

pGBKT7 (loop1-POMT1): contiene la secuencia del “loop” 1 de *POMT1*

pGBKT7 (loop5-POMT1): contiene la secuencia del “loop” 5 de *POMT1*

pGBKT7 (loop1-POMT2): contiene la secuencia del “loop” 1 de *POMT2*

pGBKT7 (loop5-POMT2): contiene la secuencia del “loop” 5 de *POMT2*

9.1.2. Quimeras *GAL4-AD* en el vector *pGADT7* o *pACT2*: posibles proteínas de interacción

9.1.2.1. Plásmidos utilizados en ensayos de homo y heterodimerización

pGADT7 que contiene las secuencias de cDNA indicadas en el apartado 9.1.1.

9.1.2.2. Plásmidos utilizados en los ensayos de interacción entre *POMT1* y *distroglicano*

Fragmentos amplificados con los cebadores del apartado 5.1.2.

pGADT7 (Dys AB): contiene la secuencia de cDNA de las subunidades α y β del *distroglicano*

pGADT7 (Dys A): contiene la secuencia de cDNA del α -*distroglicano*

pGADT7 (Dys A N-t): contiene la secuencia de cDNA del extremo N-terminal del α -*distroglicano*

pGADT7 (Dys A mucina): contiene la secuencia de cDNA de la zona tipo mucina del α -*distroglicano*

pGADT7 (Dys A C-t): contiene la secuencia de cDNA del extremo C-terminal del α -*distroglicano*

pGADT7 (Dys B): contiene la secuencia de cDNA del β -*distroglicano*

9.1.2.3. Plásmidos procedentes de una genoteca de músculo esquelético utilizados en ensayos de interacción con *POMT1* y *POMT2*

Plásmidos rescatados de una genoteca de cDNA de músculo esquelético (Clontech).

pACT2-p38IP: contiene parte del cDNA de *p38IP* (aa 483-733), (733 aa)

pACT2-CRYAB: contiene parte del cDNA de *CRYAB* (aa 37-175), (175 aa)

pACT2-COX11: contiene parte del cDNA de *COX11* (aa 86-276), (276 aa)

pACT2-HSJ2: contiene parte del cDNA de *HSJ2* (aa 40-241), (241 aa)

pACT2-Hsp40: contiene parte del cDNA de *Hsp40* (aa 59-348), (348 aa)

pACT2-ceramidasa: contiene parte del cDNA de *ceramidasa* (aa 568-761), (761 aa)

9.3. Transformación en levaduras y ensayos de interacción

9.3.1. Medio de cultivo y crecimiento

El crecimiento se llevó a cabo a 30° C, en medio SD (0,67% YNB (SIGMA), 2% glucosa pH 5,5) suplementado con una mezcla DO “drop-out” (Clontech) y los aminoácidos requeridos en cada caso: adenina, histidina, leucina, o triptófano (100 mg/ml) (SIGMA).

9.3.2. Transformación en levaduras

Las construcciones obtenidas en *E. coli* con la secuencia y pauta de lectura correctas, así como los plásmidos rescatados de la genoteca de músculo esquelético, fueron transformados en células competentes de la cepa PJ692A (Clontech) según el método descrito anteriormente (Gietz and Woods, 2002), sustituyendo el AcLi por SO_4Li_2 . Se realizó una transformación secuencial, transformando primero las quimeras Gal4-BD “cebo”, seleccionando en medio SD/DO Trp⁻, y después co-transformando con las quimeras Gal4-AD y seleccionando en medio SD/DO Trp⁻ Leu⁻.

Las levaduras cotransformadas crecieron durante dos días, y fueron resuspendidas en agua para conseguir la misma densidad óptica de 0,4 a una longitud de onda de 660 nm. Un inóculo de 5 μl de cada cotransformación se goteó a placas con medios de selección SD/DO His⁻; SD/DO Ade⁻ 2,5 mM 3-amino-triazol (3-AT), y SD/DO Ade⁻ His⁻ para determinar la activación de la transcripción de los dos genes reporteros *ADE2* e *HIS3*.

10. OBTENCIÓN DE DNA GENÓMICO

Los DNAs de clones de células ES se obtuvieron mediante los protocolos anteriormente descritos por (Ramírez-Solis *et al.*, 1993; Wurst and Joyner, 1993). Los DNAs de embriones, tejido de ratón adulto o cola de ratón se obtuvieron mediante lisis con 0,5 mg/ml de proteinasa K en una solución con 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM EDTA pH 8,0, 100 mM NaCl y 1% SDS O/N a 55° C, y posterior extracción con fenol/cloroformo (1:1).

11. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *POMT1* DE RATÓN

Para generar el cDNA completo de *Pomt1* se llevó a cabo una amplificación rápida de extremos de cDNA mediante PCR (RACE-PCR), utilizando como molde una genoteca de cDNA de embriones de 17 días (Clontech). Para la localización cromosómica se utilizó un polimorfismo *HphI* en el exón 20 entre *Mus musculus* y *Mus spretus* en los paneles de entrecruzamiento del instituto Jackson y EUCIB.

12. HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TRANSFERIDOS A MEMBRANA (*Northern Blot* Y *Southern Blot*). HIBRIDACIÓN *in situ*

12.1. Hibridación de RNAs transferidos a membranas (*Northern Blot*)

Para realizar la hibridación, se generaron sondas de cDNA marcadas con 50 μCi de [α -³²P] dCTP, utilizando el kit *Rediprime™ II Random Prime Labeling System* (Amersham Biosciences) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las membranas que contenían RNA de tejidos humanos y de ratón (OriGene Technologies, Rockville, MD), y RNA total de embriones de ratón en distintos tiempos de desarrollo (Seegene, Del Mar, CA) fueron hibridadas en solución de hibridación *PerfectHyb™ Plus HYBRIDIZATION BUFFER* (SIGMA), según el protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001). La normalización se llevó a cabo usando sondas de cDNA de β -actina humana y *GAPDH* de pollo marcadas con [α -³²P] dCTP como se ha descrito previamente en este apartado.

12.2. Preparación de embriones y tejidos de ratón para hibridación *in situ* y análisis histológico

Todas las soluciones utilizadas para la hibridación *in situ* contienen 0.1% DEPC. Para obtener embriones en distintos estadios del desarrollo, se extrajeron en PBS los úteros de hembras en varios estadios de gestación. Los embriones se fijaron en 4% paraformaldehído (PFA) en PBS O/N a 4° C para realizar la hibridación *in toto*. Asimismo, embriones o

tejidos adultos de ratón extraídos y fijados en PFA fueron embebidos en parafina o tratados con 15% sacarosa/PBS y embebidos en una solución de 15% sacarosa/7% gelatina en PBS. Después se congelaron en isopentano a -80°C . Los tejidos congelados fueron seccionados ($10\text{ }\mu\text{M}$) a -25°C en un criostato *Criocut 1900* (Leyca Microsystems). Los tejidos embebidos en parafina fueron seccionados en cortes de $7\text{ }\mu\text{M}$. La hibridación *in situ* se llevó a cabo de manera similar para embriones *in toto* o crio-secciones (Nagy *et al.*, 2003). Se generaron sondas de RNA sentido y anti-sentido de *Pomt1* con el kit de marcaje *digoxigenin RNA labeling kit* (Roche Diagnostics). Los embriones teñidos fueron fotografiados, embebidos en gelatina, congelados y seccionados ($35\text{ }\mu\text{M}$), y las secciones se montaron en *Mowiol* (Molecular Probes). El análisis histológico de inmunodetección se describe más adelante, en el apartado 13.

12.3. Transferencia de DNA genómico a membranas e hibridación con sondas de DNA (*Southern Blot*)

La transferencia se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Sambrook y Russell (2001), transfiriendo $15\text{ }\mu\text{g}$ de DNA genómico digerido con 40 U de la enzima de restricción correspondiente, a membranas de nylon *Zeta Probe^{GT} Genomic Tested Blotting Membranes* (BIORAD). Las sondas de DNA genómico fueron marcadas con $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]$ dCTP como se describe en el apartado 11.1. La hibridación se llevó a cabo como se describe en el apartado 11.1.

13. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS DE PROTEÍNAS DE RATÓN E INMUNOTRANSFERENCIA (*Western Blot*)

Todas las soluciones utilizadas contienen una mezcla de inhibidores de proteasas ($0,1\text{ mM}$ PMSF, $10\text{ }\mu\text{g/ml}$ antipaina, $0,5\text{ }\mu\text{g/ml}$ leupeptina, $1\text{ }\mu\text{g/ml}$ pepstatina, $2\text{ }\mu\text{g/ml}$ aprotinina, y un cocktail de antiproteasas (Roche Diagnostics). Los principales tejidos de ratón se extrajeron y fueron congelados inmediatamente en $\text{N}_2(\text{l})$. Cada tejido se usó para obtener ex-

tractos proteicos totales y de membrana. Los tejidos se lisaron con ayuda de un politrón a 4°C .

13.1. Extracción total de proteínas de tejido

La homogenización de los tejidos se realizó en tampón de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS). Tras 15 min. a 4°C , se centrifugó el lisado a 13.000 rpm 15 min. a 4°C y se descartó el precipitado. Se llevó a cabo una determinación de la cantidad de proteínas siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976).

13.2. Extracción de proteínas de membranas de tejido

Los tejidos se homogenizaron en solución TM1 (50 mM Tris-HCl, pH 7,5, $0,3\text{ mM}$ MgCl_2). El lisado se centrifugó a 5.000 rpm 10 min. a 4°C , y el sobrenadante se sometió a ultracentrifugación en un rotor TLA-100 a 20.000 rpm s 40 min. a 4°C , tras lo cual se lavó el precipitado en solución TM2 (50 mM TrisHCl pH 7,5, 50 mM MgCl_2 , 250 mM NaCl) y se resuspendió en solución TM2 con 15% glicerol. Se determinó la cantidad de proteínas como en el apartado 13.1.

13.3. Inmunotransferencia de proteínas a membranas e inmunodetección con anticuerpos (*Western Blot*)

Para realizar este ensayo, extractos proteicos totales ($30\text{ }\mu\text{g}$) o de membrana ($40\text{ }\mu\text{g}$) fueron sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida (6%, 8% o 10%), en presencia de SDS (Laemmli, 1970), tras lo cual se realizó una inmunotransferencia (Towbin *et al.*, 1979) a membranas de PVDF (*Immobilon PSQ 0,45 μm membranes*, Millipore). La inmunodetección se llevó a cabo tras un bloqueo de 1 h. a RT en 5% leche desnatada en polvo o en 3% BSA (SIGMA) en TBS-T, seguido de incubación con los anticuerpos primarios (1 h. a RT-O/N a 4°C) en solución de bloqueo. La detección se basó en el uso de anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa (1 h. a RT), y para el revelado se utilizó el kit *ECL* (Amersham Biosciences). Entre cada incubación se lavaron las membranas 3 veces durante 10 min. con TBS-T.

14. INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA EN EMBRIONES Y TEJIDO DE RATÓN

La inmunodetección mediante fluorescencia se llevó a cabo en secciones embebidas en parafina (7 μm) o congeladas (10 μm) de embriones en distintos tiempos de desarrollo, o bien en criosecciones de tejidos de ratón adulto obtenidas como se describe en el apartado 11.2. Los ensayos se realizaron siguiendo las instrucciones del kit M.O.M. *Mouse on Mouse Immunodetection* (Vector Laboratories). Las secciones se incubaron con anticuerpos primarios en solución M.O.M./PBS (30 min.-1 h. a RT), tras lo cual siguieron incubaciones de 15 min. con anticuerpos secundarios contra IgGs de ratón o conejo, acoplados directamente a fluorocromos o a biotina. La detección de estos últimos se llevó a cabo con estreptavidina acoplada a fluorocromos (Molecular Probes). Entre cada incubación se hicieron tres lavados de 5 min. con PBS-T. Las secciones se montaron en *Mowiol* (Molecular Probes) y se visualizaron en un microscopio de fluorescencia Nikon, o en un microscopio confocal (Leica Microsystems).

15. GENERACIÓN DEL RATÓN *KNOCKOUT* PARA EL GEN *Pomt1*

La generación del ratón *knockout* para el gen *Pomt1* se basó en el método anteriormente descrito (Capecchi, 1989a, 1989b) en el que se interrumpe el gen de interés mediante recombinación homóloga en células ES de ratón utilizando un método de selección positiva y negativa. Un esquema del proceso de obtención de un ratón *knockout* se muestra en la Figura 6.

15.1. Generación del vector de interrupción génica de *Pomt1*, pKO-Neo.

Una secuencia genómica de *Pomt1* de 15 kb (intrón 2-exón 20) se aisló de una genoteca genómica de ratón 129/SvJ (Mobi-Tec, Göttingen, Alemania), utilizando como sonda el cDNA de *Pomt1*. Para generar la construcción, se usó el vector pPNT. El brazo largo de recombinación lo constituyó un fragmento *XhoI* de 4,5 kb (intrón 2-intrón 9) clonado en el si-

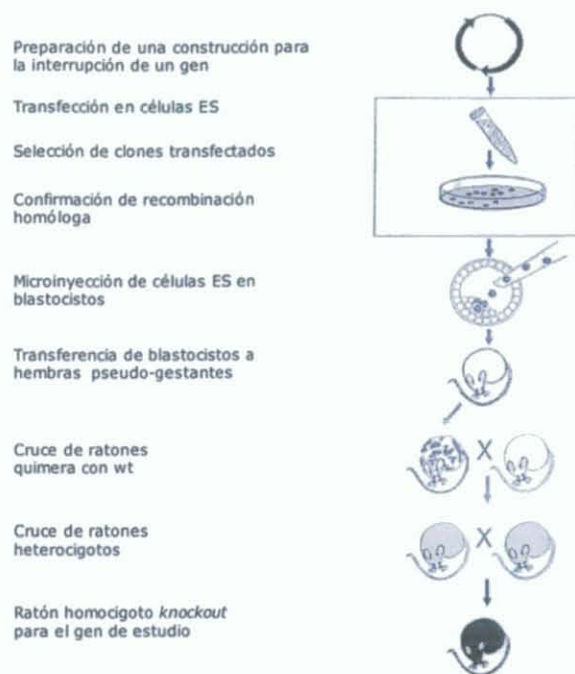


Figura 6. Esquema de la obtención de un ratón *knockout*.

tio *XhoI* de pPNT. El brazo corto lo constituyó un fragmento *KpnI-XbaI* de 2,3 kb (región intergénica 5' de *Pomt1*-intrón 1), generado mediante PCR a partir de DNA genómico de ratón 129/SvJ con los cebadores *a* y *b* (apartado 5.2.). Este fragmento fue clonado en los sitios *KpnI* y *XbaI*, entre los genes de selección *neo* y *hsv tk*, y en dirección opuesta. En la construcción pKO-Neo, el gen *neo* sustituye al exón 2, que contiene el ATG iniciador y zonas de los intrones flanqueantes.

15.2. Cultivo de células ES

15.2.1. Medio de cultivo y crecimiento de células ES

DMEM glutamax (GIBCO BRL), 15% FBS (GIBCO BRL), 50 μM β -mercaptoetanol, aminoácidos no esenciales (Invitrogen), 50 $\mu\text{g/ml}$ Penicilina/50 $\mu\text{g/ml}$ Estreptomina, *Pen/Strep* (GIBCO BRL), 1000 U/ml LIF ESGRO (Chemicon). Las células se incubaron a 37° C, 5% CO_2 y 95% humedad en un incubador de células.

15.2.2. Obtención de células nutrientes de ES (MEFs: *mouse embryonic fibroblast*)

Las células ES crecen sobre una capa de células embrionarias, que aportan al medio nutrientes y un factor

inhibidor de leucinas, LIF que impide su diferenciación. Las células nutrientes de ES se obtuvieron a partir de embriones de 13.5–15.5 dpc procedentes de cruces de ratones transgénicos que expresaban el gen *neo*, siguiendo el protocolo descrito por Nagy *et al.* (2003), con ciertas modificaciones: los embriones se extrajeron en medio de disección 1% BSA, 6 mM glucosa en PBS, con antibióticos y antifúngicos (*Pen/Strep* (GIBCO) y 2,5 µg/ml anfotericina B). Cada embrión se lavó bien en etanol y agua estéril bidestilada antes de ser homogenizado. La inactivación de los fibroblastos se realizó con 10 µg/ml de mitomicina C (SIGMA) durante 2 h. 30 min. en incubador de células.

15.3. Electroporación de DNA plasmídico en células ES e identificación de clones recombinantes

15.3.1. Electroporación

El proceso se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Nagy *et al.* (2003). El plásmido pKO-Neo (20 µg) digerido con *NotI* se introdujo en 10 millones de células ES E14.1 de ratón 129P2/Ola, con ayuda de un electroporador (BIORAD gene pulser II). Las condiciones de electroporación fueron de un pulso a 500 µF y 0.25KV. La mezcla de electroporación se repartió a 5 placas p100 conteniendo fibroblastos inactivados. Los clones crecieron de 8 a 10 días en medio de selección (350 µg/ml G-418 y 2 µM Ganciclovir (SIGMA)) renovado cada día. Los clones resistentes se aislaron en placas de 96 pocillos con fibroblastos inactivados. Al cabo de dos días se duplicaron en p96, para congelar (en medio de congelación 2X, 80% FBS, 20% DMSO (SIGMA)), y para extraer el DNA en p96 (Ramirez-Solís *et al.*, 1993), o bien en p24 (Wurst and Joyner, 1993) previamente tratadas con 0,1% gelatina (SIGMA).

15.3.2. Identificación de clones recombinantes

Los clones recombinantes se identificaron mediante PCR utilizando los cebadores 1 y 2 (apartado 5.2.) y fueron confirmados por *Southern Blot* de DNA digerido con *StuI* (MBI Fermentas) e hibridado con la sonda KO, situada fuera del brazo largo de homología.

15.3.3. Microinyección de células ES en blastocistos e implantación

Los blastocistos para la microinyección se obtuvieron a partir de hembras BALB/c de 3 a 6 semanas de edad, en las que se indujo superovulación mediante inyección intraperitoneal de PMGS (5 UI), y a las 48 h. de gonadotropina coriónica humana hGC (5 UI). Estas hembras fueron cruzadas con machos para fertilizar los oocitos, y a día 3.5 después de la aparición del tapón vaginal, los blastocistos fueron recogidos del infundíbulo en medio M2 (Quinn *et al.*, 1982). Los clones recombinantes positivos de células ES 129P2/Ola se inyectaron en blastocistos BALB/c (Gardner, 1968). Estos blastocistos fueron implantados en el útero de hembras pseudogestantes (2.5 dpc) cruzadas con machos BALB/c vasectomizados, para generar quimeras que transmitiesen la modificación en la línea germinal (Bradley *et al.*, 1984). Estas quimeras se cruzaron con ratones *wild-type* BALB/c para generar heterocigotos, que se cruzaron entre sí para obtener homocigotos.

15.3.4. Determinación del genotipo de ratones

La determinación del genotipo de ratones se llevó a cabo mediante PCR con los cebadores 3, 4 y 5 (apartado 5.2.) o mediante *Southern Blot* con DNA de biopsias de 0,5 cm de cola de ratón de 3 ó 4 semanas, obtenido como se indica en el apartado 10. Del mismo modo se determinó el genotipo de embriones procedentes de distintas etapas del desarrollo.

16. GENERACIÓN DE QUIMERAS ES^{Pomt1^{-/-}}

Para la obtención de clones de células ES alterados en ambos alelos de *Pomt1*, se generó una nueva construcción, pKO-Puro, utilizando la construcción pKO-Neo. En esta construcción se sustituyó el gen de resistencia a neomicina del plásmido pKO-Neo, por un fragmento *Clal* procedente del vector pBABE-PURO, que contenía el gen de resistencia a puromicina (*pu-ro*), bajo el control del promotor del virus SV40. El proceso de electroporación en células ES 129P2/Ola *Pomt1^{-/-}*, procedentes de uno de los clones que resultó positivo en la generación del ratón KO de *Pomt1*

(5F3), se llevó a cabo como en el apartado 15.3.1., añadiendo 2 $\mu\text{g/ml}$ puomicina al medio de selección. Los clones se analizaron mediante PCR usando los cebadores 1 y 6 (apartado 5.2.), y *Southern Blot* de DNA digerido con *StuI*, e hibridando con la sonda KO, para determinar si había ocurrido recombinación homóloga en el alelo restante (*wt*). El clon resultante de células $\text{ES}^{\text{Pomt1-/-}}$ con los genes *neo* y *puro* respectivamente se utilizó para llevar a cabo varias rondas de microinyección en blastocistos BALB/c (apartado 15.3.3), que fueron implantados en hembras pseudogestantes para obtener ratones con distinto grado de quimerismo. Para aumentar el porcentaje de éxito en la gestación de estas hembras, junto con los blastocistos microinyectados, se transfirieron algunos blastocistos *wt*.

16.1. Determinación del grado de quimerismo

El porcentaje de contribución de las células $\text{ES}^{\text{Pomt1-/-}}$ en la formación de los distintos tejidos u órganos, frente al porcentaje de contribución de las células

ES endógenas, se determinó mediante *Southern Blot*. El DNA de los principales tejidos fue digerido con *BglII* e hibridado con la sonda ES.

16.2. Estudios de comportamiento

16.2.1. Rota-rod

Los ratones quimera de entre 6 y 9 meses de edad se sometieron a un test de capacidad motora (Jones and Roberts, 1968), en un aparato Rota-rod (UGO BASILE, Italia). Tras dos entrenamientos de 30 seg. con aceleración de 4-16 rpm, se registró el tiempo de permanencia sobre la barra rotatoria llevando a cabo 3 carreras de un máximo de 120 seg. con una aceleración de 4 a 44 rpm e intervalos de 5 min. entre cada carrera durante 5 días.

16.2.2. Respuesta auditiva del tallo cerebral

(ABR: auditory brainstem response)

El ensayo de ABR (Henry, 1985) se basa en la presentación de estímulos que activan las neuronas del recep-

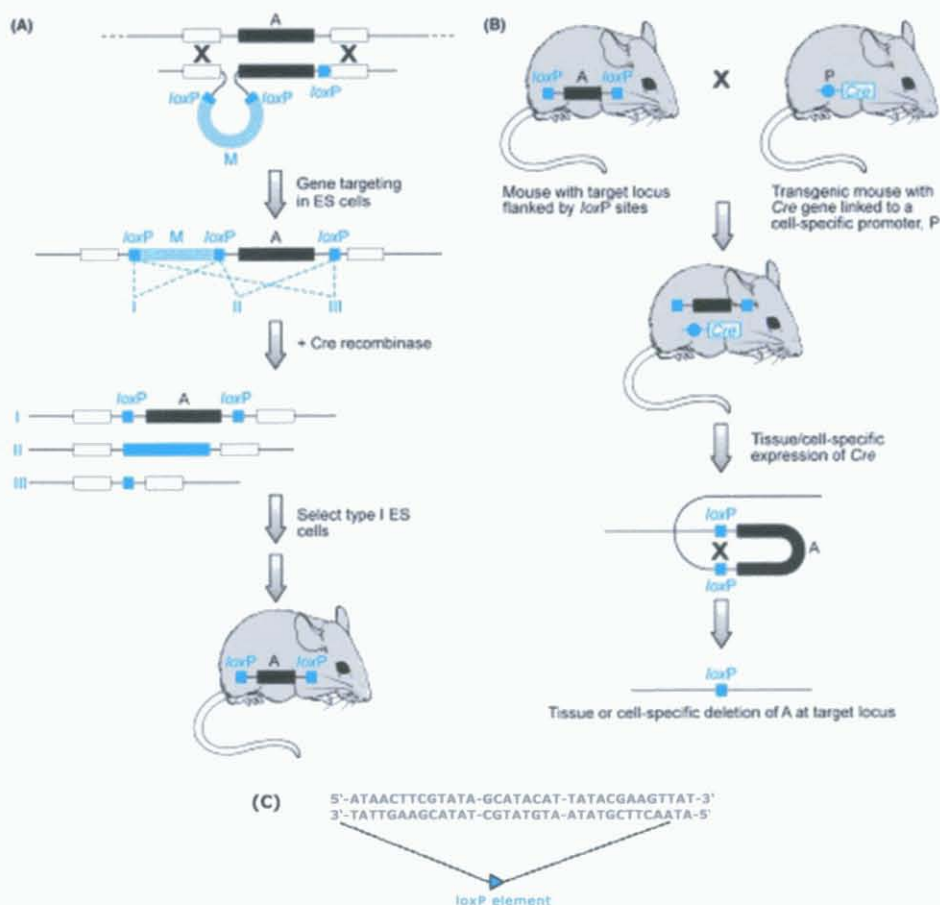


Figura 7. Esquema general de la generación de un ratón *knockout* condicional basado en el sistema CRE-loxP. (A) Esquema de la obtención de un ratón $\text{loxP}^+/\text{loxP}^+$. (B) Estrategia de cruce con ratones transgénicos CRE. (C) Estructura de un elemento *loxP*.

tor auditivo (órgano de Corti). Los animales fueron anestesiados (Ketamina 100 mg/Kg / Xilacina 10 mg/Kg). Se presentaron estímulos en forma de *clicks*, a distintos niveles de intensidad auditiva (desde 90 dB hasta 10 dB), a una frecuencia de 30, 60 u 80 *clicks* por segundo. Cada *click* generó una respuesta eléctrica, que se recogió como un potencial evocado, mediante electrodos colocados en la cabeza del ratón. El potencial generado presenta 5 picos en los primeros 6 a 8 mseg. desde el comienzo de la señal auditiva. La intensidad menor a la que se distinguieron los cinco picos determinó el umbral auditivo de cada ratón.

17. GENERACIÓN DE UN RATÓN *KNOCKOUT* CONDICIONAL PARA EL GEN *Pomt1* MEDIANTE EL SISTEMA CRE-Lox-P.

El procedimiento para la obtención de estos ratones se muestra en la Figura 7.

17.1. Generación del vector pKOc

La construcción se basó en la diseñada por (Gu *et al.*, 1994), con el gen de selección *neo* flanqueado por dos elementos loxP, y un tercer elemento loxP situado en un intrón de *Pomt1*, de manera que permitiese eliminar una zona esencial de *Pomt1*. Para el clonaje se utilizó el vector pPNT y los cebadores del apartado 5.2. En la figura 8 se muestra un esquema de la construcción pKOc. Un primer fragmento *EcoRI-XhoI* de 3,7 kb (in-

trón 4-intrón 9), obtenido mediante PCR con los cebadores *c* y *d*, fue clonado en los sitios *EcoRI-XhoI* de pPNT. El DNA molde fue el usado en la construcción pKO-Neo (apartado 15.1.). Un fragmento *XbaI* de 1,9 kb con el gen *neo* flanqueado por dos elementos loxP (generado mediante PCR con los cebadores *e* y *f* utilizando como molde el vector pPNT) fue clonado en el sitio *XbaI* del intrón 6 de *Pomt1* previamente clonado en pKOc. De este modo, quedaría un brazo corto de recombinación homóloga de 2,2 kb (intrón 4-intrón 6). Un tercer fragmento de 5,9 kb (intrón 9-intrón 13) se obtuvo mediante PCR con los cebadores *g* y *h* a partir de la secuencia genómica de *Pomt1* y se clonó en los sitios *SalI-NotI* del plásmido pSL301, donde se realizó el subclonaje de un fragmento *BamHI/KpnI* generado mediante PCR con los cebadores *i*, *j* para introducir un tercer elemento loxP en el sitio *BamHI* del intrón 11. Posteriormente, este fragmento se clonó en los sitios *XhoI-NotI* del vector pKOc. De este modo, el brazo largo de recombinación deseado sería de 4,3 kb (intrón 11-intrón 13) de *Pomt1*. El plásmido pKOc se linearizó con *NotI* (20 µg) y se electroporó en células ES E14.1 como se describió en el apartado 14.3. Los clones recombinantes de células ES se identificaron mediante PCR usando los cebadores 2 y 7 (apartado 5.2.), y fueron confirmados por *Southern Blot* de DNA genómico digerido con *HindIII*, utilizando dos sondas (*a* y *b*) en las regiones 5' y 3' respectivamente.

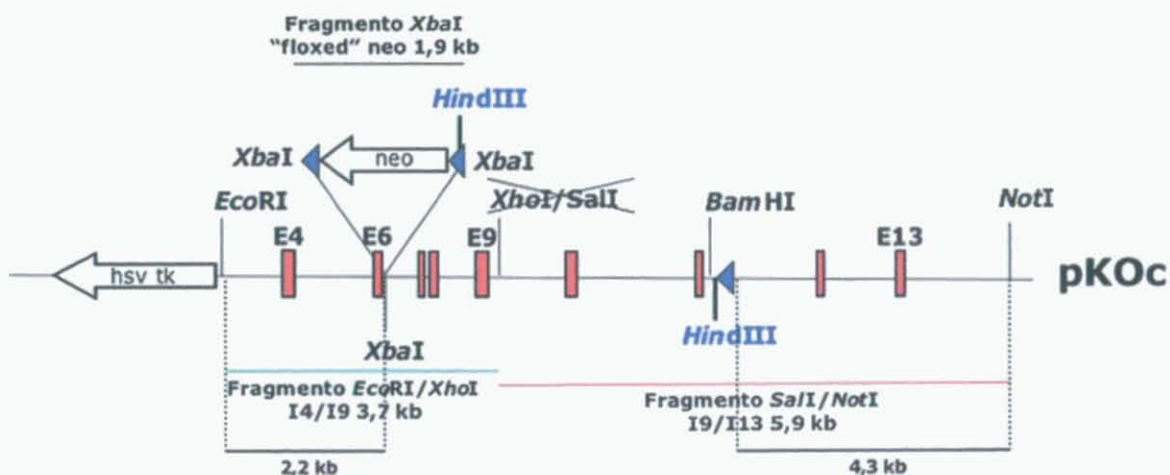


Figura 8. Esquema representativo de la generación de la construcción para el *knockout* condicional. Los fragmentos generados por PCR con los exones de *Pomt1* (en rojo) están indicados por barras. Las dianas de enzimas de restricción utilizadas para los distintos clonajes están indicadas en negro. Las dianas extra *HindIII*, introducidas para poder identificar los elementos loxP, están en azul. Las zonas que constituirán los brazos de recombinación de 2,2 kb y 4,3 kb se indican con barras negras.

RESULTADOS

1. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN DE POMT1 MEDIANTE EL SISTEMA DE DOBLE HÍBRIDO EN LEVADURAS

1.1. p38IP y HSJ2 interaccionan con el “loop”1 y el “loop”5 de POMTs

Mediante el sistema de doble híbrido en levadura pretendíamos identificar *in vivo* alguna proteína que interaccionase con POMT1. Los primeros ensayos en este sistema realizados en el laboratorio fueron llevados a cabo por el Dr. Juan Manuel Falcón Pérez, quien realizó el rastreo de una genoteca de cDNA de músculo esquelético clonada en el vector pACT2 y pretransformada en la cepa PJ692A (*MATCHMAKER Two-Hybrid System 3* [Clontech]). Se utilizó como “cebo” el “loop” 1 de POMT1 situado entre los dominios transmembrana I y II de la zona luminal del R.E., que sería el equivalente al “loop” 1 de *SdPmt1*. Se había descrito que este “loop” era esencial para la actividad manosiltransferasa en levadura (Girrbach *et al.*, 2000). El “loop” 1 fusionado al dominio de unión del factor de transcripción *Ga4* (*Ga4*-BD) en el vector pGBKT7 y las proteínas fusionadas al dominio de activación de *Ga4* (*Ga4*-AD) provenientes de la genoteca, al interaccionar, activarían la transcripción de los genes reporteros en la levadura donde se están expresando.

Se realizó el rastreo en una genoteca de cDNA de músculo esquelético humano, ya que pensábamos que el α -dístroglicano (componente del complejo glicoproteico de distrofina (DGC) de células musculares) podría de ser la principal diana de manosilación de POMT1 al poseer multitud de O-manosilglicanos (Chiba *et al.*, 1997). Entonces no se había demostrado aún que el α -dístroglicano era O-ma-

nosilado por POMTs (Manya *et al.*, 2004). De este rastreo, aunque no se detectó el α -dístroglicano, resultaron positivos para la interacción con el “loop” 1 seis clones. Estos clones de levadura contenían plásmidos que expresaban fragmentos de proteína que correspondían a: p38IP (proteína de interacción con p38), CRYAB (α -cristalina B), COX11 (citocromo oxidasa 11, chaperona de cobre), HSJ2 (proteína de choque térmico homóloga a DNAJ bacteriana), Hsp40 (proteína de choque térmico 40) y ceramidasa mitocondrial, siendo la mayoría de estas proteínas chaperonas (*resultados sin publicar*). En paralelo se llevaron a cabo todos los controles pertinentes de interacción positivos y negativos para descartar posibles falsos positivos.

Ya que parecía que los “loops” 1 y 5 de las PMTs podrían estar implicados en la actividad manosiltransferasa, al menos en levadura (Girrbach *et al.*, 2000), quisimos comprobar si las mismas proteínas que interaccionaron con el “loop” 1 de POMT1 lo hacían también con el “loop” 5 de POMT1, o con los “loop” 1 y 5 de POMT2.

Los plásmidos rescatados de la genoteca se utilizaron para comprobar esa posible interacción mediante un ensayo de doble híbrido dirigido. El crecimiento de las levaduras en medio selectivo carente de adenina e histidina reveló que existía interacción entre el “loop” 5 de POMT1 y las proteínas p38IP y HSJ2 (Fig. 9). El mismo ensayo realizado con los “loops” 1 y 5 de POMT2 determinó que el “loop” 1 de POMT2 interaccionaba con p38IP, HSJ2 y ceramidasa mitocondrial. Por otro lado, el “loop” 5 de POMT2 interaccionaba únicamente con p38IP y HSJ2. En ambos casos se activaba la transcripción de los genes reporteros *ADE2* e *HIS3* en la levadura cotransformada con cada uno de estos plásmidos, y

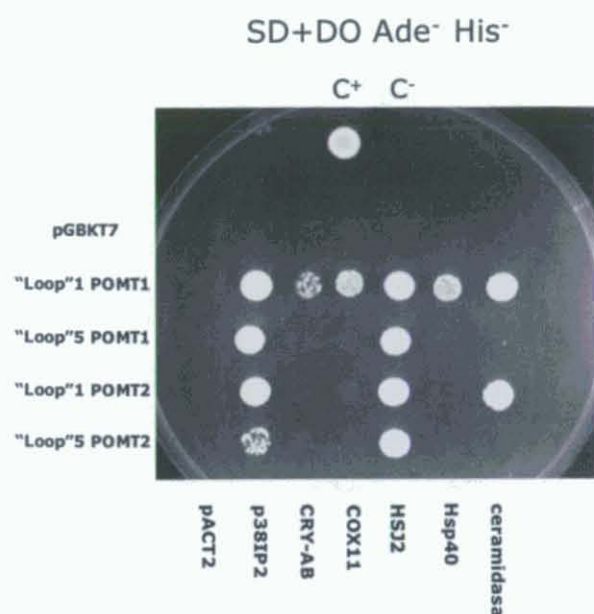


Figura 9. Sistema de doble híbrido dirigido. Ensayo de Interacción entre POMT1 y POMT2 con las proteínas de la genoteca de músculo esquelético detectadas previamente con el "loop"1 de POMT1. Crecimiento en medio selectivo. (C⁺) control positivo de interacción entre p53 y el antígeno T (AgT). (C⁻) control negativo de interacción entre lamina C y AgT. A la izquierda de la imagen se indican los plásmidos que contienen el "cebo" fusionado al dominio Gal4-BD. En la parte inferior de la imagen se indican los plásmidos de la genoteca que contienen las proteínas de interacción fusionadas a Gal4-AD.

los cebos correspondientes (Fig. 9). Los resultados obtenidos podrían sugerir de algún modo que estas proteínas, en general, podrían participar con su función de chaperonas en el procesamiento y plegamiento de POMT1 o de sus dianas de manosiación, y que al menos p38IP y HSJ2 podrían ser diana de manosiación de POMTs, ya que interaccionan con los "loops" de POMT1 y POMT2 supuestamente implicados en la actividad manosiltransferasa.

1.2. El sistema de doble híbrido no permite detectar formación de dímeros entre POMT o interacción con distroglicano

Se llevaron a cabo más estudios de doble híbrido dirigido con el objeto de determinar si POMT1 era capaz de formar homodímeros o heterodímeros con POMT2, ya que este tipo de complejos entre las PMTs había sido descrito previamente en levaduras (Girrbach and Strahl, 2003).

En el ensayo de interacción entre POMT1 y POMT2 utilizamos como "cebo" los "loops" 1 y 5 de POMT1, y como posibles proteínas de interacción los "loops" 1 y 5 de POMT1 y POMT2. La ausencia de crecimiento en medio carente de adenina e histidina determinó que los "loops" de las POMTs no participaban en la formación de heterocomplejos entre POMT1 y POMT2 (*no se muestran los datos*). Del mismo modo, la ausencia de crecimiento en medio selectivo indicó que los "loops" de POMT1 tampoco participaban en la formación de homodímeros (*no se muestran los datos*).

Teniendo en cuenta la hipótesis mencionada anteriormente de que el distroglicano pudiera ser diana de manosiación de POMT1, se llevó a cabo un ensayo de doble híbrido dirigido entre ambas proteínas para determinar si POMT1 interaccionaba con el distroglicano en algún dominio concreto. Para ello se utilizaron como cebo los "loops" 1 y 5 de POMT1, y como proteínas de interacción fragmentos de distintas zonas del α y β distroglicano. Nuevamente, los resultados indicaron ausencia de interacción entre POMT1 y los fragmentos del distroglicano mediante este sistema (*no se muestran los datos*), lo cual no descarta que exista una verdadera interacción a través de otros dominios o zonas de POMT1.

2. CARACTERIZACIÓN DEL GEN *Pomt1* MURINO

El cDNA completo de *Pomt1* (Nº acceso al GenBank AY494857), comprende 2.885 pb, que predicen una proteína de 724 aa desde el ATG situado en el exón 2. Este ATG es el más conservado evolutivamente, en lugar de otro hipotético ATG iniciador que se encuentra en el exón 1. El gen de ratón ocupa en el genoma 18.416 pb, y su organización en 20 exones está muy conservada con respecto al genoma humano (Fig. 10A). El gen *Pomt1* se localiza en el cromosoma 2 del ratón, en el centimorgan (cM) 21 entre los marcadores D2Mit120 y D2Mit152 en el panel de entrecruzamiento EUCIB, y entre los genes *Abl* y *Pbx3* en el panel de entrecruzamiento del Jackson Institute (Fig. 10B). Esta región cromosómica 2B conserva sintenia con el cromosoma humano 9q34.1, que es la zona donde se localiza *POMT1* (Jurado *et al.*, 1999).

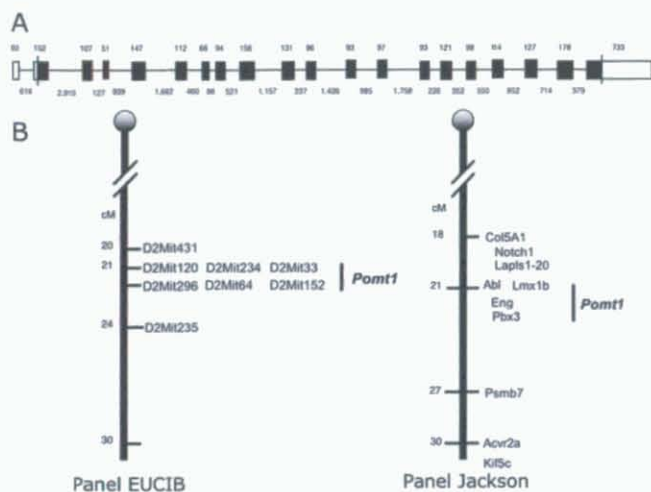


Figura 10. Caracterización del gen *Pomt1* de ratón. (A) Representación esquemática de la estructura exón-intrón del gen *Pomt1*. El locus genómico contiene 20 exones. La longitud de los exones está indicada en pares de bases. El tamaño de los intrones no está a escala. Los exones están representados por cajas. En negro se representa la secuencia codificante. (B) Posicionamiento de *Pomt1* en los paneles de entrecruzamiento de EUCIB y del Instituto Jackson.

3. ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DEL mRNA Y LA PROTEÍNA POMT1

3.1. La expresión de *POMT1* es similar en tejidos humanos y de ratón adulto

Para determinar el patrón de expresión de *Pomt1* y compararlo con el de *Pomt2* en el ratón y con el de *POMT1* en humano, realizamos ensayos de *Northern Blot* en varias membranas conteniendo RNAs de distintos tejidos humanos y de ratón adulto.

En todos los tejidos de ratón analizados, con una sonda de cDNA de *Pomt1* se detectó un único mensajero de 2,9 kb, aunque la expresión variaba notablemente de unos tejidos a otros, siendo máxima en testículo y mínima en músculo esquelético (Fig. 11A). La misma membrana hibridada con una sonda de cDNA de *Pom2* reveló niveles de expresión parecidos, detectándose dos mensajeros de 4,7 kb y 2,7 kb en todos los tejidos, resultado de sitios alternativos de poliadenilación. Además, en testículo se detectaron dos mensajeros más largos de 5,1 kb y 3,1 kb, respectivamente (Fig. 11B), que provienen de inicios de transcripción diferentes, tal como se describiera anteriormente (Willer *et al.*, 2002).

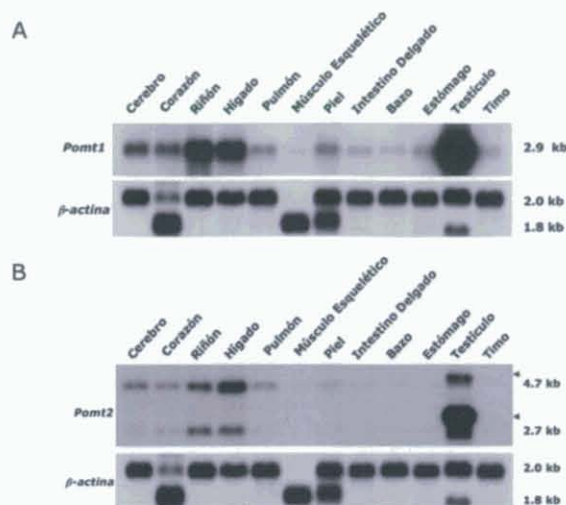


Figura 11. Expresión de los genes *Pomt1* y *Pomt2* en ratón adulto. *Northern Blot* de distintos tejidos de ratón hibridado con sondas de cDNA de *Pomt1*, *Pomt2*, y una sonda control de β -actina (2.0 kb y 1.8 kb). (A) Expresión de *Pomt1*. La banda de 2.9 kb corresponde al mensajero de *Pomt1*. (B) Expresión de *Pomt2*. Las bandas de 2.7 y 4.7 kb corresponden a los mensajeros de *Pomt2*. Las bandas adicionales de testículo (5.1 kb y 3.1 kb) están señaladas con flechas.

En cuanto a la expresión en humano, una membrana que contenía RNAs procedentes de distintos tejidos fue hibridada con una sonda de cDNA de *POMT1*. Se detectó un único mensajero de 3.1 kb en los tejidos analizados, y un patrón de expresión muy similar al de ratón (Fig. 12), sugiriendo que podría existir correlación entre el papel que desempeña *POMT1* en el ratón y en el humano.

3.2. *Pomt1* se expresa a lo largo de la embriogénesis del ratón

Puesto que *Pomt1* parece estar relacionado con enfermedades neuromusculares congénitas tales como el

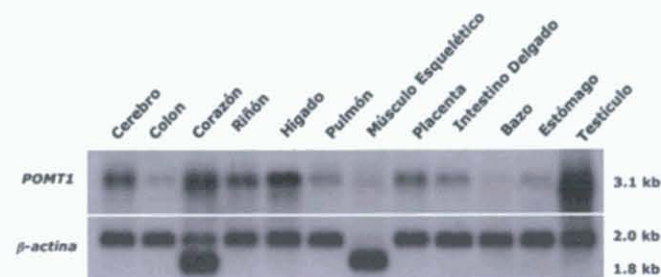


Figura 12. Expresión del gen *POMT1* humano. *Northern Blot* de distintos tejidos de adulto hibridado con una sonda de cDNA de *POMT1* y con una sonda control de β -actina (2.0 kb y 1.8 kb). La banda de 3.1 kb corresponde al mensajero de *POMT1*.

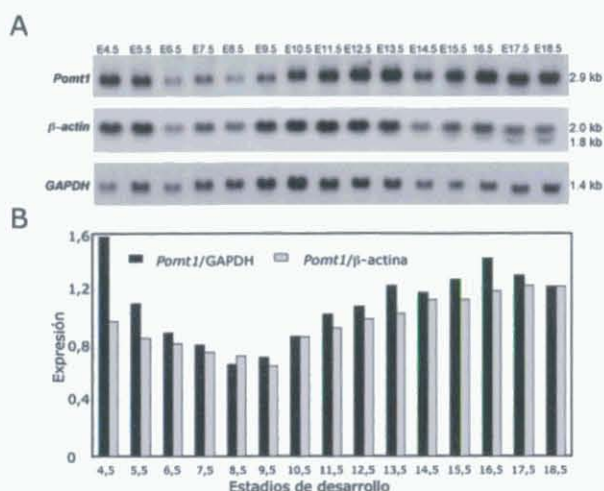


Figura 13. Expresión del gen *Pomt1* durante el desarrollo embrionario del ratón. (A) Northern Blot de distintos estadios de desarrollo hibridado con una sonda de cDNA de *Pomt1* y con sondas control de β -actina (2.0 kb y 1.8 kb) y GAPDH (1.4 kb). La banda de 2.9 kb corresponde al mensajero de *Pomt1*. (B) Representación de la expresión de *Pomt1* con respecto a β -actina y GAPDH.

síndrome de Walker-Warburg (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002), quisimos establecer el patrón de expresión de *Pomt1* a lo largo del desarrollo embrionario del ratón. El análisis de RNA total de distintas etapas del desarrollo embrionario mediante Northern Blot reveló que *Pomt1* se expresaba durante toda la embriogénesis (Fig. 13A y B), detectándose niveles más altos de expresión en las primeras etapas, aunque estos datos deberían interpretarse con cuidado, ya que esta alta expresión podría deberse a contaminación de RNA de tejido materno (nota del fabricante, Seegene, del Mar. USA). Aun así, la expresión de *Pomt1* parecía disminuir ligeramente durante la gastrulación (E6.5-7.5), para volver a aumentar más tarde en el comienzo de la organogénesis (E9.5), y seguir aumentando paulatinamente hasta el final del desarrollo embrionario, sugiriendo que *Pomt1* juega un papel importante durante la embriogénesis.

3.3. *Pomt1* se expresa en los tejidos relacionados con WWS durante la embriogénesis

Para examinar en más detalle la expresión de *Pomt1* durante el desarrollo embrionario, se realizó una hibridación *in situ* con sondas sentido y antisentido de RNA de *Pomt1* en embriones completos (*in toto*) ob-

tenidos en distintas etapas del desarrollo (E7.5-E13.5). A día 7.5, mediante este método no pudimos detectar el mensajero de *Pomt1*. En etapas más tardías se detectaron niveles basales de expresión de manera relativamente ubicua, aunque se observaron zonas determinadas donde la expresión de *Pomt1* era más fuerte. Así, a día 8.5, *Pomt1* se detectaba a lo largo del tubo neural y en la zona dorsal de los pliegues neurales del futuro cerebro medio (Fig. 14A y B). En secciones transversales, *Pomt1* se detectó en los somitas (Fig. 14C). A día 9.0, *Pomt1* se seguía expresando a lo largo del tubo neural (Fig. 14D y E), y en el ojo en desarrollo (Fig. 14F). En secciones transversales, los mensajeros de *Pomt1* se detectaron principalmente en la zona ventral del tubo neural, incluyendo la zona donde emergen las neuronas motoras, en la placa del suelo de la notocorda y en el intestino endodérmico (Fig. 14F). A día 10.5, *Pomt1* se detectó principalmente en los somitas, en el mesénquima donde emergen las extremidades, en el ganglio trigeminal y en el ojo en desarrollo (Fig. 14G, y H). En secciones anteriores a la zona donde emergen las extremidades posteriores, la expresión de *Pomt1* se observó en la capa del manto del tubo neural dorsal, y en el dermomiótomo de los somitas (Fig. 14I).

Este patrón de expresión concreto, sugiere que *Pomt1* está implicado en el desarrollo del músculo, el sistema nervioso y el ojo, que son los tejidos que se ven más afectados en pacientes con WWS.

Para determinar si se mantenía el patrón de expresión de *Pomt1* en etapas más avanzadas en el desarrollo embrionario, llevamos a cabo hibridación *in situ* en embriones de 12.5 dpc y 13.5 dpc. A día 12.5 existían niveles basales de expresión de manera ubicua en el embrión. La expresión de *Pomt1* se mantenía a lo largo de la médula espinal y en las extremidades en desarrollo (Fig. 15A y B), aunque la máxima expresión se concentró en la región cefálica, donde se está formando el cerebro (Fig. 15A-C). Un día más tarde, a día 13.5, la expresión de *Pomt1* seguía siendo relativamente ubicua en el embrión. Se mantenía tanto en el ojo en desarrollo, como en las extremidades (Fig. 15D-E) y en la médula espinal (Fig. 15D-F), pero

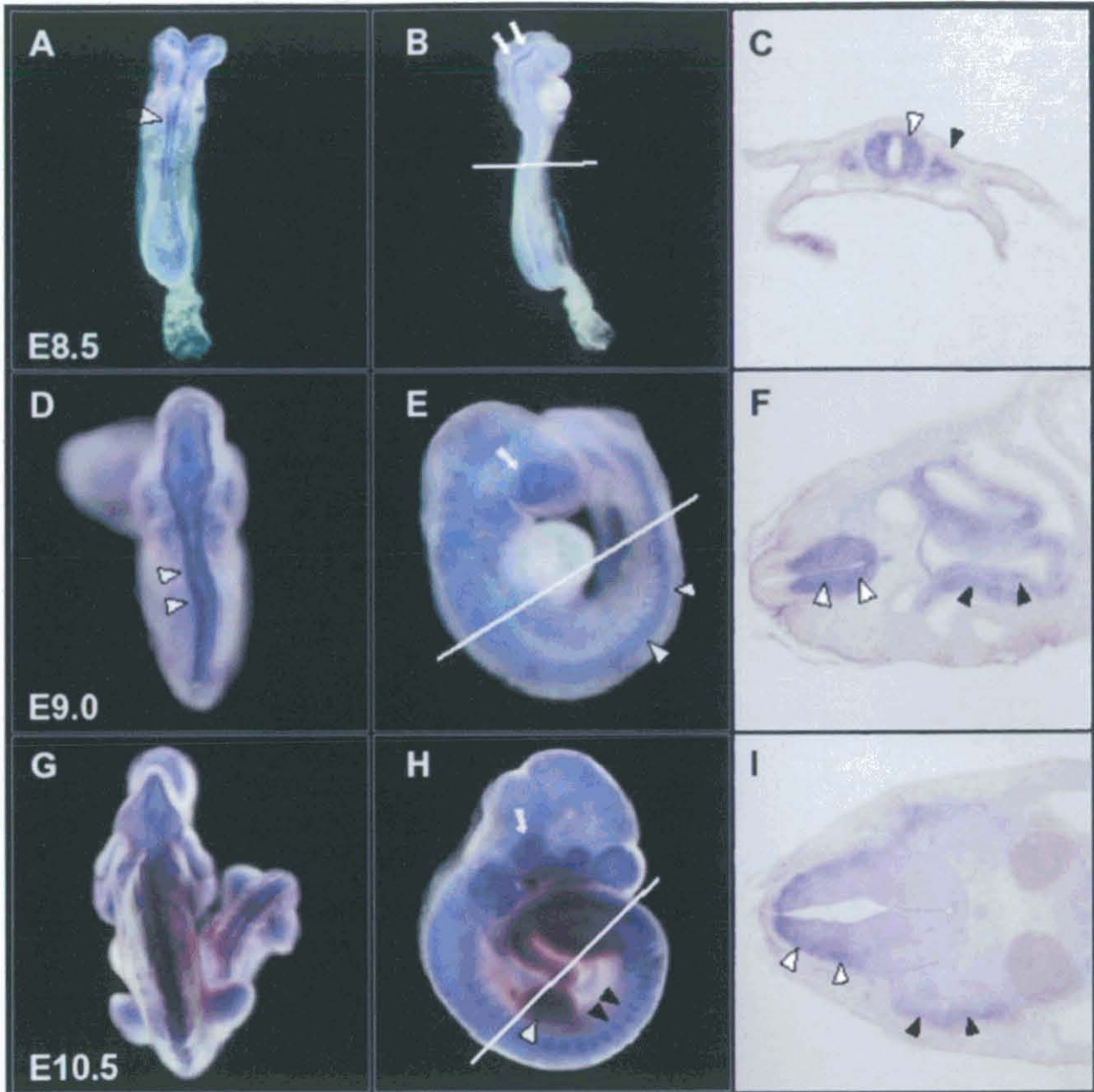


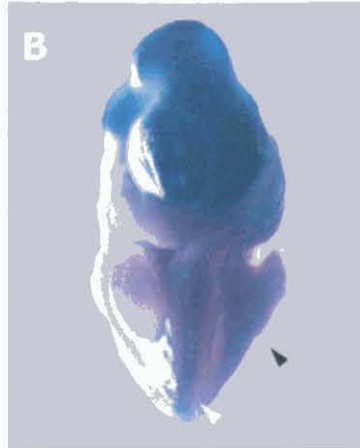
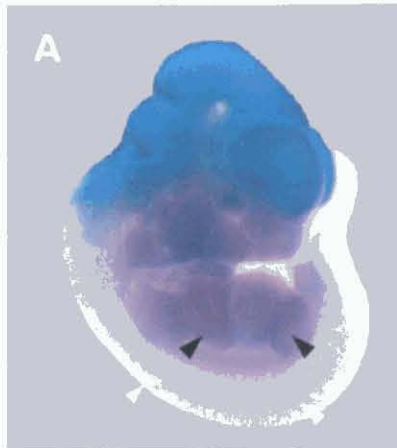
Figura 14. Expresión *in toto* de *Pomt1* en embriones de ratón (E8.5-E10.5). Hibridación *in situ* (A, B, D, E, G y H) y criosecciones representativas (C, F, e I) de las zonas indicadas por barras blancas en B, E y H, respectivamente. (A-C) Expresión de *Pomt1* a día E8.5 en el tubo neural (punta de flecha blanca), en la zona dorsal de los pliegues neurales (flechas blancas) y en los somitas (punta de flecha negra). (D-F) Expresión de *Pomt1* a día 9.0, en la zona ventral del tubo neural (puntas de flecha blancas), en el ojo en desarrollo (flecha blanca) y en el intestino endodérmico (puntas de flecha negras). (G y H) Expresión de *Pomt1* a día 10.5 en los somitas (puntas de flecha negras), en las extremidades emergentes (punta de flecha blanca) y en el ganglio trigeminal (flecha blanca). (I) Expresión de *Pomt1* en cortes transversales en la capa del manto del tubo neural dorsal (puntas de flecha blancas) y en el dermomiótomo (puntas de flecha negras).

parecía disminuir ligeramente en la región cefálica (Fig. 15D-F). En este estadio se detectaron niveles altos de expresión de *Pomt1* en la región del hocico y la boca, mientras que en el tronco, la expresión se concentró principalmente en el corazón (Fig.15B).

A día 12.5, en el cerebro anterior ya se han formado los ventrículos laterales en los futuros hemisferios

cerebrales, el diencéfalo comienza a diferenciarse para dar lugar al hipotálamo, el tálamo y el epitalamo. En la zona más rostral del cerebro posterior, comienza a diferenciarse el cerebelo a partir del metencéfalo, y la médula oblonga se forma a partir del mielencéfalo y el techo del cuarto ventrículo. Éste se encuentra súperdesarrollado, y comienza a invaginarse a partir del

E12.5



E13.5

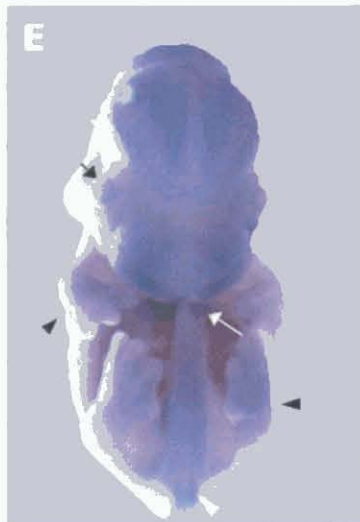


Figura 15. Expresión *in toto* (hibridación *in situ*) de *Pomt1* en embriones de ratón (E12.5 y E13.5). (A-C) Expresión de *Pomt1* a día 12.5, en la región cefálica, en las extremidades emergentes (puntas de flecha negras) y en la médula espinal (puntas de flecha blancas). (D-F) Expresión de *Pomt1* a día 13.5, en el ojo en desarrollo (D y E) (flechas negras), en las extremidades (puntas de flecha negras), en el corazón (flecha blanca) y en la médula espinal (D-F) (puntas de flechas blancas).

mismo el plexo coroideo, fuente de líquido cefalorraquídeo (LCR) en esta zona. Adicionalmente se formarán plexos coroideos en el tercer ventrículo y en los ventrículos laterales (Kaufman and Bard, 1999).

Teniendo en cuenta estos datos y los obtenidos de la expresión de *Pomt1* en la región cefálica, que vemos en más detalle en secciones transversales (Fig. 16), podemos decir que *Pomt1* se expresa en las principales zonas que constituyen el cerebro y el cerebelo en desarrollo. Más concretamente, en el cerebro posterior, la expresión de *Pomt1* se detecta en la capa del manto del mielencéfalo (Fig. 16D-F), en la línea endimaria de la placa basal del metencéfalo (Fig. 16D-G), y en el techo del cuarto ventrículo, donde se observa la máxima expresión (Fig. 16A-H). Éste aparece en su forma más característica, alargado y estrecho, en la figura 16F.

El plexo coroideo del cuarto ventrículo se forma a partir de la invaginación de las células endimarias, que se cubren por una capa externa de pia muy vascularizada. El LCR fluye a través del sistema ventricular (conectado con el canal central de la médula espinal) por el espacio subaracnoideo del cerebro. Se reabsorbe principalmente por medio de las granulaciones aracnoideas, y sale hacia la médula espinal a través de unas aperturas llamadas foramina de Lucks y Magendie, situadas en los laterales y en la zona medial del techo del cuarto ventrículo respectivamente. Cuando estas aperturas se obstruyen, los ventrículos se llenan de LCR y se produce hidrocefalia. La expresión concreta de *Pomt1* en el cuarto ventrículo podría relacionar a *Pomt1* con la hidrocefalia con que cursan los enfermos de WWS.

En el cerebro anterior, la expresión de *Pomt1* se concentró en la línea endimaria del tercer ventrí-

E12.5

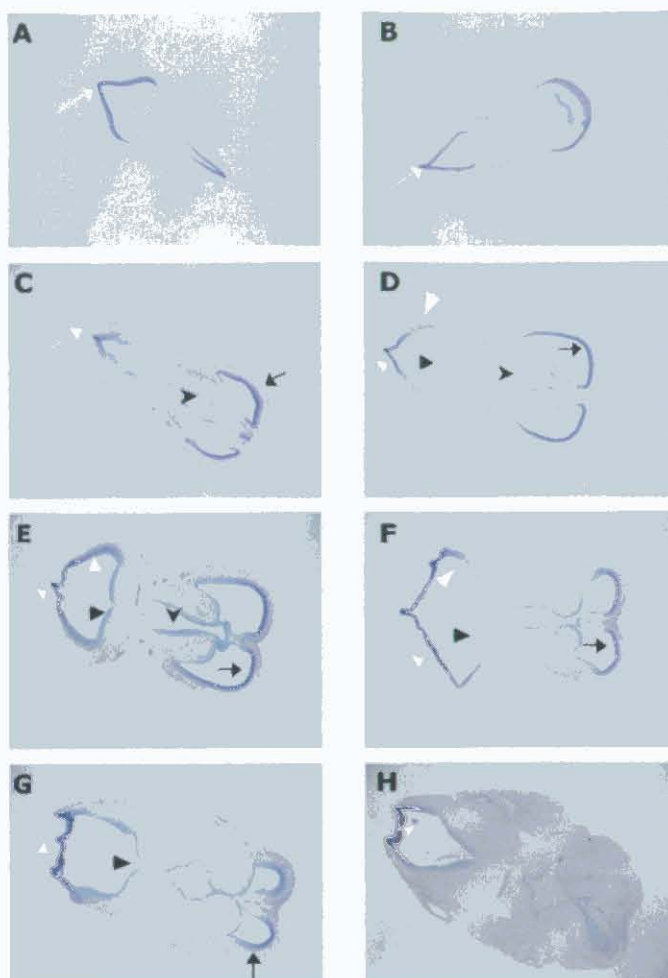
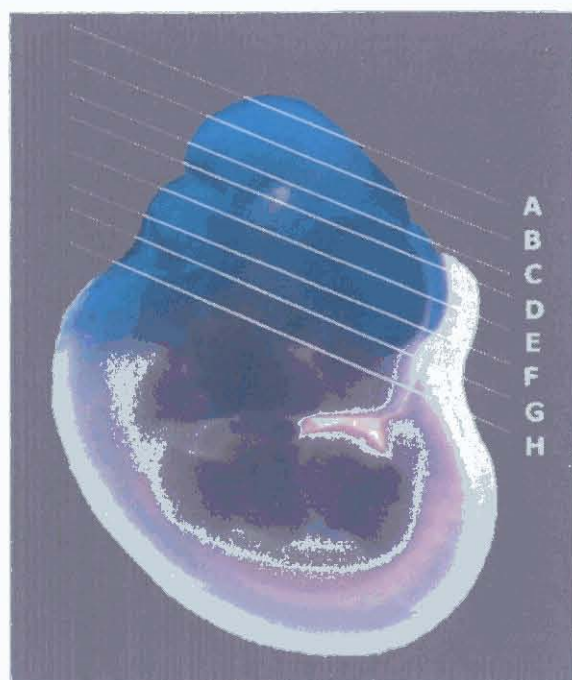


Figura 16. Expresión *in toto* (hibridación *in situ*) de *Pomt1* en embrión de ratón a día 12.5. (A-H) Criosecciones representativas de la región cefálica (indicadas por barras blancas). Expresión de *Pomt1* en la capa del manto del mielencéfalo (puntas de flecha blancas, D-F), en la capa endimaria del suelo del metencéfalo (puntas de flecha negras, D-G), en la capa endimaria del tercer ventrículo (puntas de flecha abierta negras, C-E), en el techo del cuarto ventrículo (flechas blancas, A-H) y en la capa del manto de las vesículas telencefálicas (flechas negras, C-G).

culo y los ventrículos laterales, aunque su expresión era más intensa en la capa del manto de las vesículas telencefálicas (Fig. 16C-G). El techo de estas vesículas comienza, ya a día 12 a estratificarse para formar el cortex neopallial, que irá variando en grosor a medida que migren los neuroblastos desde la capa del manto hacia la capa marginal. Esta estructura se convertirá en la corteza cerebral de los hemisferios cerebrales. Parece que la expresión de *Pomt1* se detecta en la capa del manto donde se están produciendo mitosis de los neuroblastos que migrarán más tarde hacia la capa marginal (Fig. 17B-D).

Cuando la migración neuronal no ocurre correctamente se originan graves anomalías en el cortex cerebral. En humanos, defectos en el mecanismo de la migración neuronal provocan entre otras malformaciones,

liscencefalia, o lo que es lo mismo cerebro liso sin circunvoluciones (Kato and Dobyns, 2003). La liscencefalia es otra característica clínica más que presentan los enfermos con el síndrome de Walker-Warburg.

En cuanto a la expresión de *Pomt1* a lo largo de la médula espinal, ésta quedó relegada a la capa de células endimarias que se encuentran más en contacto con el lumen o canal central (*no se muestran los datos*).

Avanzando un día más en el desarrollo (13.5), el patrón de expresión de *Pomt1* en la región cefálica fue parecido al detectado a día 12.5. *Pomt1* se localizó en la capa del manto de las vesículas telencefálicas y en el techo del cuarto ventrículo principalmente (Fig. 18A). En el ojo en desarrollo se detectaron niveles basales de *Pomt1* en la capa pigmentada (externa) y la capa neural (interna) de la retina, así como en las fi-

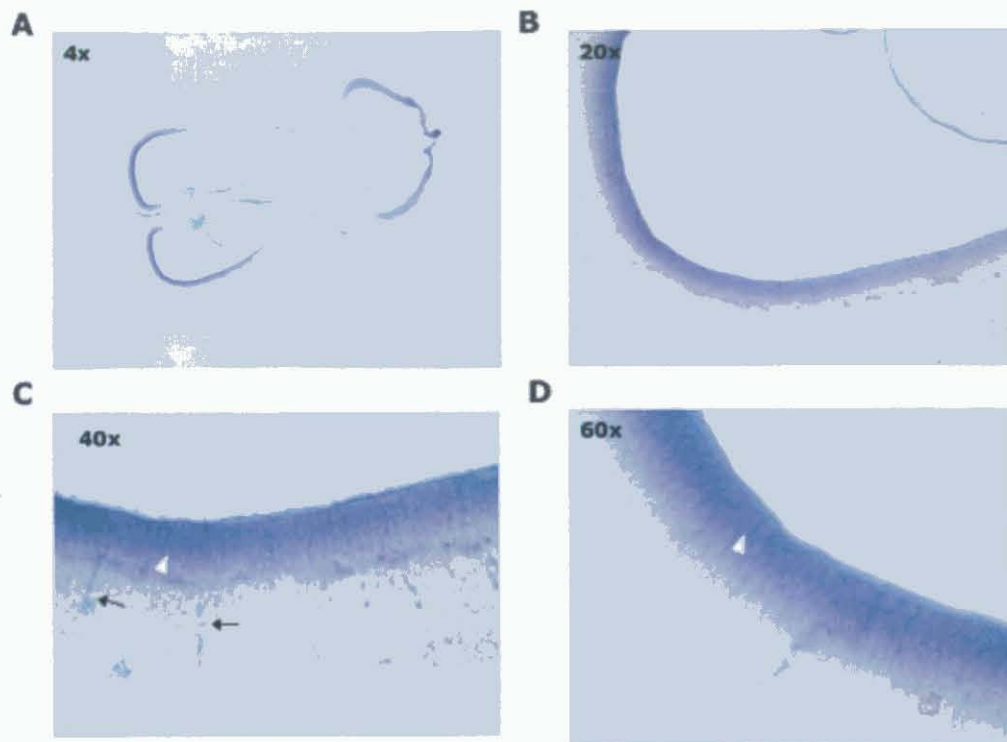


Figura 17. Expresión *in situ* de *Pomt1* en la región cefálica del embrión a día 12.5 a distintos aumentos. A 4X, B 20X, C 40X y D, 60X. Expresión de *Pomt1* en la capa del manto de las vesículas telencefálicas (B-D), concretamente en los neuroblastos que están sufriendo mitosis antes de comenzar la migración neuronal (puntas de flecha blancas), y en neuroblastos que parecen estar migrando hacia la capa marginal (flechas negras).

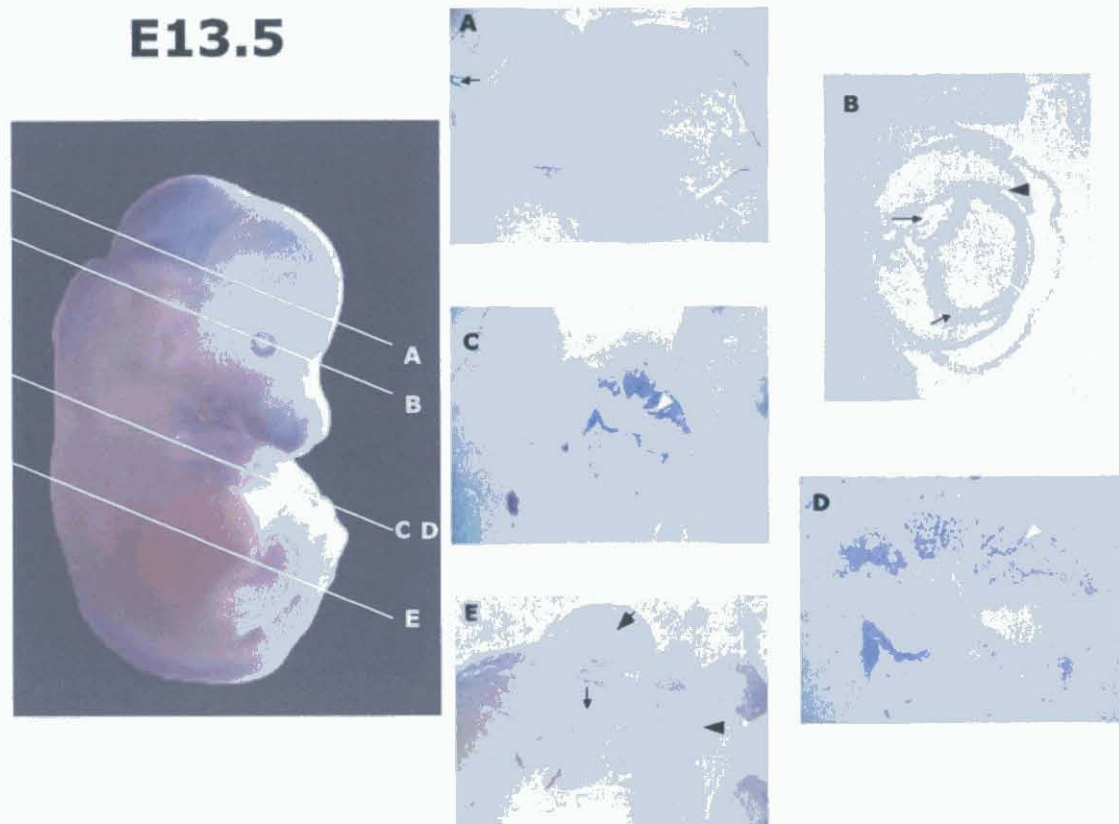


Figura 18. Expresión *in toto* (hibridación *in situ*) de *Pomt1* en embrión de ratón a día 13.5. (A-E) Críoeccepciones representativas del embrión (indicadas por barras blancas). A, C, y E: 4X; B y D: 10X. (A) Expresión de *Pomt1* en el techo del cuarto ventrículo (flecha negra) y en la capa del manto de las vesículas telencefálicas (flecha blanca). (B) Expresión de *Pomt1* en el ojo en desarrollo: en la capa pigmentada (punta de flecha blanca) y la capa neural de la retina (punta de flecha negra), las células de la retina (flecha blanca) y en los vasos de la cavidad haloidea (flechas negras). (C y D) Expresión de *Pomt1* en las paredes de los ventrículos del corazón (puntas de flecha blancas). (E) Expresión de *Pomt1* en las paredes del intestino (flecha pequeña negra), en los músculos de las extremidades (flecha grande negra), en el tubérculo genital (punta de flecha negra) y en los nervios segmentales de la cola (flechas blancas).

bras de la lente. La mayor expresión se localizó en la cavidad haloidea, concretamente en los vasos de la red vascular asociados a la lente y a la capa neural de la retina, que formarán el humor vítreo (Fig. 18B). En la región torácica, los más altos niveles de RNA de *Pomt1* se detectaron en las paredes de los ventrículos del corazón (Fig. 18C y D). Por último, *Pomt1* fue detectado tanto en los músculos de las extremidades, como en los epitelios del futuro intestino delgado, así como en el tubérculo genital y los nevios segmentales de la cola (Fig. 18E).

Los datos obtenidos, en conjunto, revelan que el patrón de expresión de *Pomt1* se mantiene a lo largo del desarrollo embrionario del ratón, concentrándose principalmente en aquellas zonas que van a dar lugar al músculo, el ojo y el cerebro.

3.4. En el ratón adulto *Pomt1* se expresa en músculo esquelético y corazón, donde el α -dístroglicano se encuentra glicosilado

Basándonos en la expresión de *Pomt1* detectada mediante *Northern Blot* e hibridación *in situ*, quisimos determinar si en el ratón adulto podíamos identificar niveles parecidos de proteína. Para ello utilizamos un anticuerpo generado contra la zona central del "loop" 5 de POMT1 humano, que reconoce también la proteína de ratón, ya que existe un alto porcentaje de homología de secuencia aminoacídica en esa zona: 12 de los 15 aa que forman el péptido contra el que se generó el anticuerpo son idénticos.

No siempre existe correlación entre la expresión de un RNA mensajero con la expresión de la proteína correspondiente. De hecho, los niveles de expresión del mRNA de *Pomt1* detectados en músculo esquelético fueron tan débiles (ver figura 11) que uno esperaba no encontrar la proteína en este tejido. Hay indicios que nos hacen pensar que *Pomt1* debería ejercer su función en el músculo esquelético, ya que supuestamente se encarga de añadir residuos de manosa directamente sobre las serinas o treoninas del α -dístroglicano, única diana de manosilación de POMT1 descrita hasta el momento (Manya *et al.*, 2004), que se encuentra formando parte del complejo glicoproteico de

distrofina en células musculares. El α -dístroglicano está presente en varios tejidos y aunque su secuencia aminoacídica predice una proteína de unos 70 KDa, su peso molecular varía de un tejido a otro dependiendo del grado de glicosilación que presente. Así, migra a la altura de 120 KDa en cerebro y nervio periférico, de 140 KDa en corazón y de 156 KDa en músculo esquelético (Martin, 2003).

Nuestros datos de *Western Blot* de extractos proteicos totales de tejidos de ratón adulto, utilizando un anticuerpo que reconoce específicamente epítopos glicosilados del α -dístroglicano (VIA-4), revelaron que esta proteína se encuentra glicosilada de forma variable en corazón, músculo esquelético, cerebro y riñón, aunque no parece haber glicosilación en hígado, y en testículo parecen detectarse niveles de glicosilación muy bajos (Fig. 19A).

Puesto que *Pomt1* es una proteína integral de membrana de R.E., no detectada en extractos proteicos totales (*no se muestran los datos*), el análisis mediante *Western Blot* se realizó con extractos proteicos de membrana de los mismos analizados para la expresión del α -dístroglicano. Los únicos tejidos donde se detectó la proteína fueron músculo esquelético y corazón (Fig. 19B). El peso molecular predicho para la se-

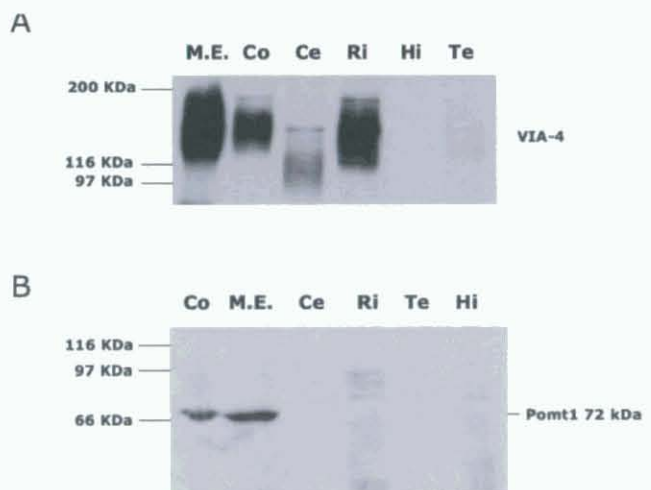


Figura 19. *Western Blot* de extractos proteicos de tejido de ratón adulto. M.E: músculo esquelético; Co: corazón; Ce: cerebro; Ri: riñón; Hi: hígado; Te: testículo. (A) Extractos de proteína total (30 µg) incubados con el anticuerpo VIA-4. El diferente peso molecular en cada tejido viene determinado por su grado de glicosilación. (B) Extractos de membrana (40 µg) incubados con el anticuerpo anti-POMT1. La banda de 72 kDa detectada en corazón y músculo esquelético corresponde a la proteína Pomt1.

cuencia aminoacídica de Pomt1 es de 82 KDa, y la banda que se detectó correspondería aproximadamente a una proteína con un peso molecular aparente de 72 KDa. La diferencia de tamaño detectado con respecto al tamaño predicho, podría deberse a un comportamiento aberrante en la migración que ciertas proteínas transmembrana sufren debido al alto contenido en aminoácidos hidrófobos, como es el caso de Pomt1. Este hecho se observa en la familia de las PMTs de levaduras (Girrbach *et al.*, 2000) y en la proteína Pomt2 (Willer *et al.*, 2002).

3.5. En músculo y corazón de ratón adulto, Pomt1 se localiza en el retículo sarcoplasmático, al igual que su homóloga Pomt2

Para determinar la localización concreta de Pomt1 en tejido muscular, realizamos ensayos de inmunofluo-

rescencia indirecta en criosecciones de músculo esquelético y corazón. En las células musculares, Pomt1 se detectó en el retículo sarcoplasmático, así como en la región de la membrana plasmática o sarcolema, más concretamente en la zona subsarcolémica de estas células (Fig. 20B), ya que Pomt1 no es una proteína integral de membrana plasmática. En la célula muscular, el retículo sarcoplasmático se sitúa entre las miofibrillas, formando un entramado reticular. Sin embargo, justo por debajo de la membrana plasmática, el retículo sarcoplasmático está en contacto directo con la misma a través de los llamados túbulos T, por lo que vemos continuidad de la señal de Pomt1 en esa zona. En secciones de corazón, Pomt1 se detectó en el retículo sarcoplasmático de las células de músculo cardíaco (Fig. 20E). El mismo patrón de expresión en ambos tejidos mostró el marcador de R.E. calnexina (*no se muestran los datos*).

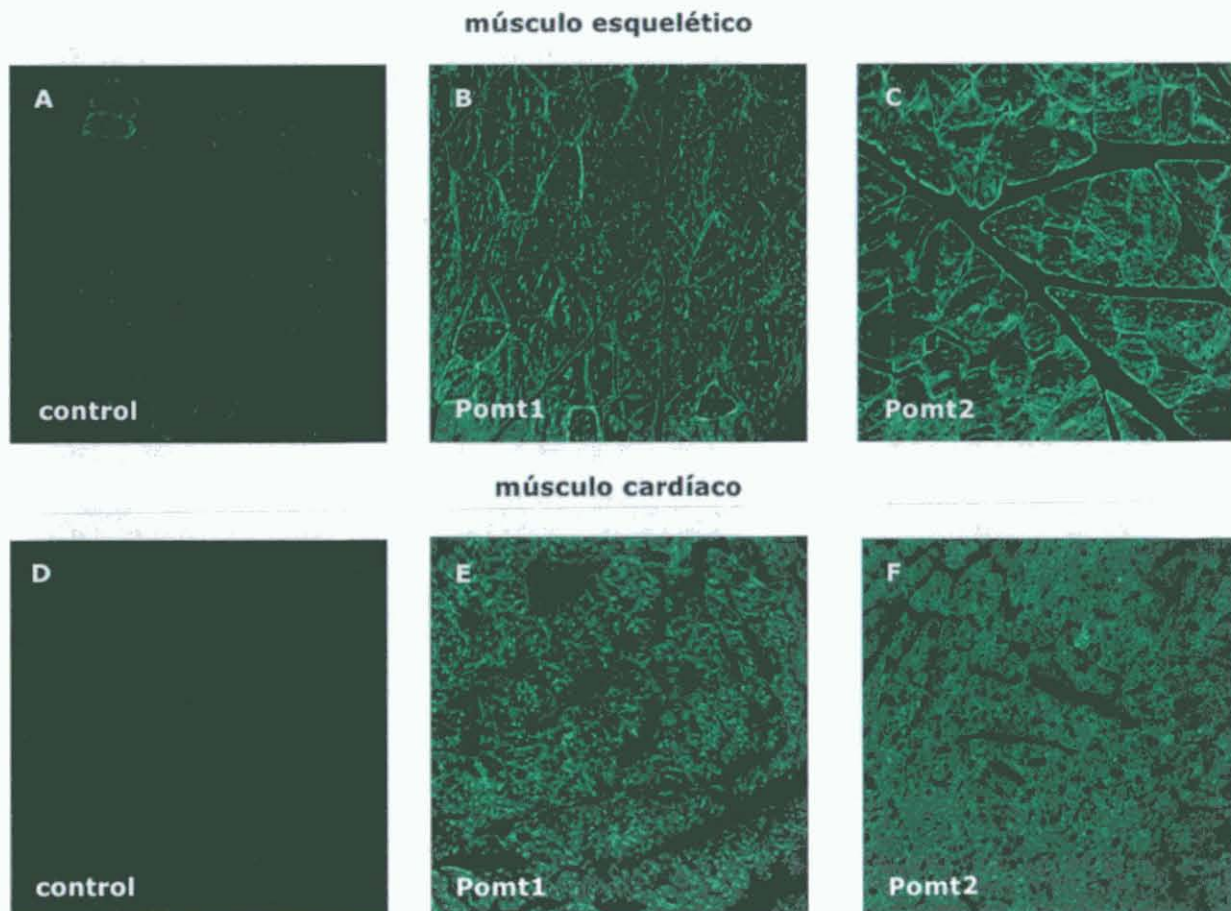


Figura 20. Inmunodetección de Pomt1 y Pomt2 en criosecciones de tejido muscular. (A-C) Músculo esquelético, (D-F) músculo cardíaco. Control sin anticuerpo primario (A y D), incubación con anti-POMT1 (B y E) y anti-POMT2 (C y F). Detección de Pomt1 y Pomt2 en el retículo sarcoplasmático de las fibras musculares (B, C, E, y F).

POMT1 y POMT2 parecen actuar conjuntamente para conferir la máxima actividad enzimática. El patrón de expresión del mensajero de ambas es muy parecido tanto en humano como en ratón. Sería lógico pensar que las dos proteínas deberían hallarse en los mismos tejidos. Para comprobar si ocurría lo mismo con la proteína utilizamos un anticuerpo generado contra una secuencia aminoacídica del "loop 5" de POMT2 humano (aa 373-470) (*cedido amablemente por la Dra. Sabine Strahl*). Esta secuencia presenta un 94% de homología con respecto a la secuencia de ratón. Los resultados de inmunofluorescencia indirecta en secciones de músculo esquelético y cardíaco mostraron un patrón de localización de Pomt2 muy similar al de Pomt1 (Fig. 20C y F), indicando que ambas proteínas se localizan en los mismos compartimentos.

En las distrofias musculares congénitas es denominador común el déficit de glicosilación del α -dístroglicano (Haliloglu and Topaloglu, 2004; Muntoni *et al.*, 2004), por lo que quisimos determinar más concretamente la localización de Pomt1 con relación al dístroglicano en éstas células.

Se realizaron ensayos de inmunofluorescencia indirecta en criosecciones de músculo esquelético con la pareja de anticuerpos anti-POMT1 y VIA-4,

y la pareja de anticuerpos anti-POMT1 y anti- β -DG. El anticuerpo monoclonal VIA-4 reconoce residuos glicosídicos del α -dístroglicano en la periferia de las células musculares, mientras que el anticuerpo monoclonal anti- β -DG reconoce la subunidad β del dístroglicano, que está anclada a la membrana y se encuentra hacia la zona citosólica. Los resultados mostraron que los anticuerpos que reconocen el dístroglicano se localizan en la zona de la membrana plasmática o sarcolema (Fig. 21B y E), mientras que el anticuerpo que reconoce Pomt1 lo hace en el interior de las células (Fig. 21A y D), aunque se observa colocalización con el β -dístroglicano y los residuos glicosídicos del α -dístroglicano en la región del sarcolema (Fig. 21C y F). La colocalización aparente de Pomt1 con el β -dístroglicano se explicaría por la continuidad de R.E. que hay por debajo de la membrana plasmática. La colocalización con los residuos glicosídicos del α -dístroglicano podría deberse a que, al encontrarse en la periferia de la membrana, prácticamente no se aprecia diferencia entre la señal que proviene del interior o el exterior de la célula. Este tipo de colocalización se observa también al realizar una doble detección con anticuerpos que

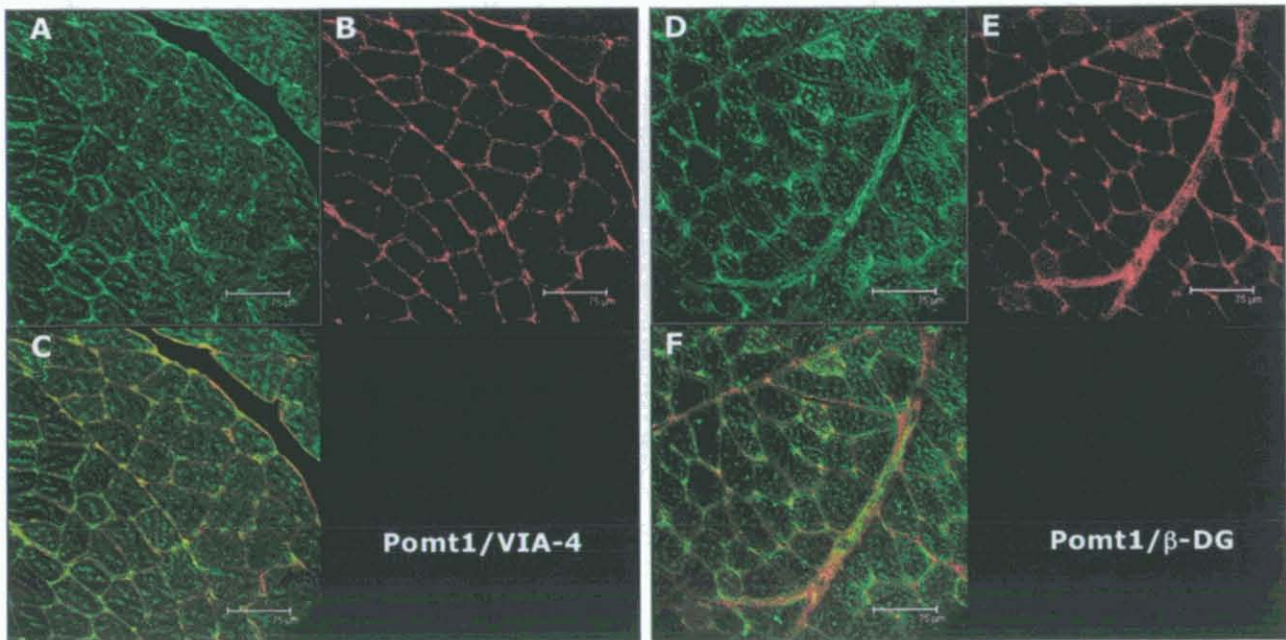


Figura 21. Doble inmunodetección de Pomt1 y dístroglicano en criosecciones de músculo esquelético. (A-C) Incubación con anticuerpos anti-POMT1 (verde) y anti- α -dístroglicano (VIA-4, rojo). (D-F) Incubación con anticuerpos anti-POMT1 (verde) y anti- β -dístroglicano (β -DG, rojo). (C y F) Superposición de las detecciones de Pomt1 y dístroglicano.

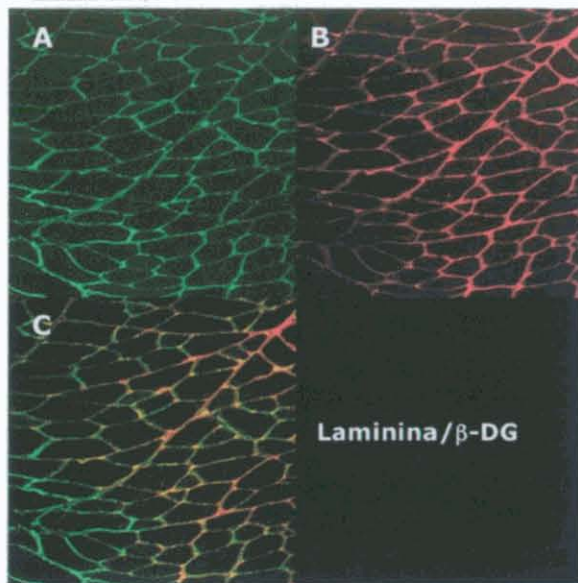


Figura 22. Doble inmunodetección de laminina y distroglicano en criosecciones de músculo esquelético. Incubación con los anticuerpos anti-laminina (verde) y anti- β -distroglicano (β -DG, rojo). (C) Superposición de la detección de laminina y β -distroglicano.

reconocen el β -distroglicano y la laminina, componente de la matriz extracelular (Fig. 22).

3.6. El mRNA de *Pomt1* se expresa en las células promotoras de las células germinales masculinas, y la proteína se localiza en el acrosoma, un compartimento celular específico de espermátidas

El mayor nivel de expresión de *Pomt1* detectado mediante *Northern Blot* en ratón adulto se observó en el testículo. Además algunos enfermos con WWS presentan displasia testicular gonadoblastoide (Hung *et al.*, 1998). Quisimos establecer la relación de *Pomt1* con este tejido, determinar su expresión y la localización celular concreta, para lo cual realizamos ensayos de hibridación *in situ* e inmunofluorescencia indirecta en criosecciones de testículo.

En el testículo tiene lugar la maduración de las células germinales masculinas o espermatogénesis, proceso por el cual las células de los túbulos seminíferos sufren una serie de divisiones y transformaciones hasta convertirse en espermatozoides (Gard-

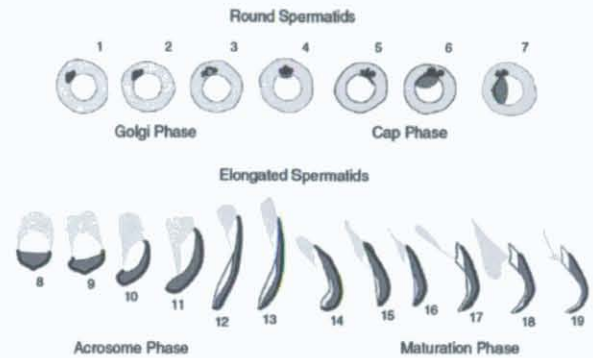


Figura 23. (Abou-Haila and Tulsiani, 2000. *Archives of Biochemistry and Biophysics*). Diagrama que ilustra los 19 estadios de la espermiogénesis. Fase Golgi: 1-3; fase de cubierta: 4-7; fase de acrosoma: 8-14; fase de maduración: 15-19. Los estadios varían entre especies: conejo y rata, 19 estadios; ratón, 16 estadios; hombre, 6 estadios.

ner, 1966). Las espermatogonias al dividirse por mitosis dan lugar a espermatoцитos primarios, que entran en meiosis para producir espermátidas. Éstas sufren un proceso de diferenciación denominado espermiogénesis, por el cual se transforman en espermatozoides (Fig 23). Estas células tienen la peculiaridad de ser transcripcionalmente inactivas; el proceso de diferenciación para dar lugar a espermatozoides ocurre mediante reorganización nuclear y cambios morfológicos en el citoplasma (Dadoune, 1994; Hecht, 1998).

Tras la meiosis se produce un intenso periodo de actividad transcripcional, en el cual los RNAs se almacenan en forma de ribonucleoproteínas. Existe un mecanismo por el cual cada RNA se traduce en estadios posteriores cuando se requiere la proteína que codifica (Schmidt *et al.*, 1999).

Mediante hibridación *in situ*, el mensajero de *Pomt1* se detectó principalmente en dos tipos de células precursoras de células germinales: las espermatogonias y los espermatoцитos primarios, no detectándose niveles significativos de expresión en las células post-meióticas (espermátidas en proceso de diferenciación o espermatozoides maduros) (Fig. 24A-C). Puede que el mensajero de *Pomt1* no se almacene en forma de ribonucleopartículas para traducirse más tarde, ya que de ser así debería detectarse en las espermátidas en

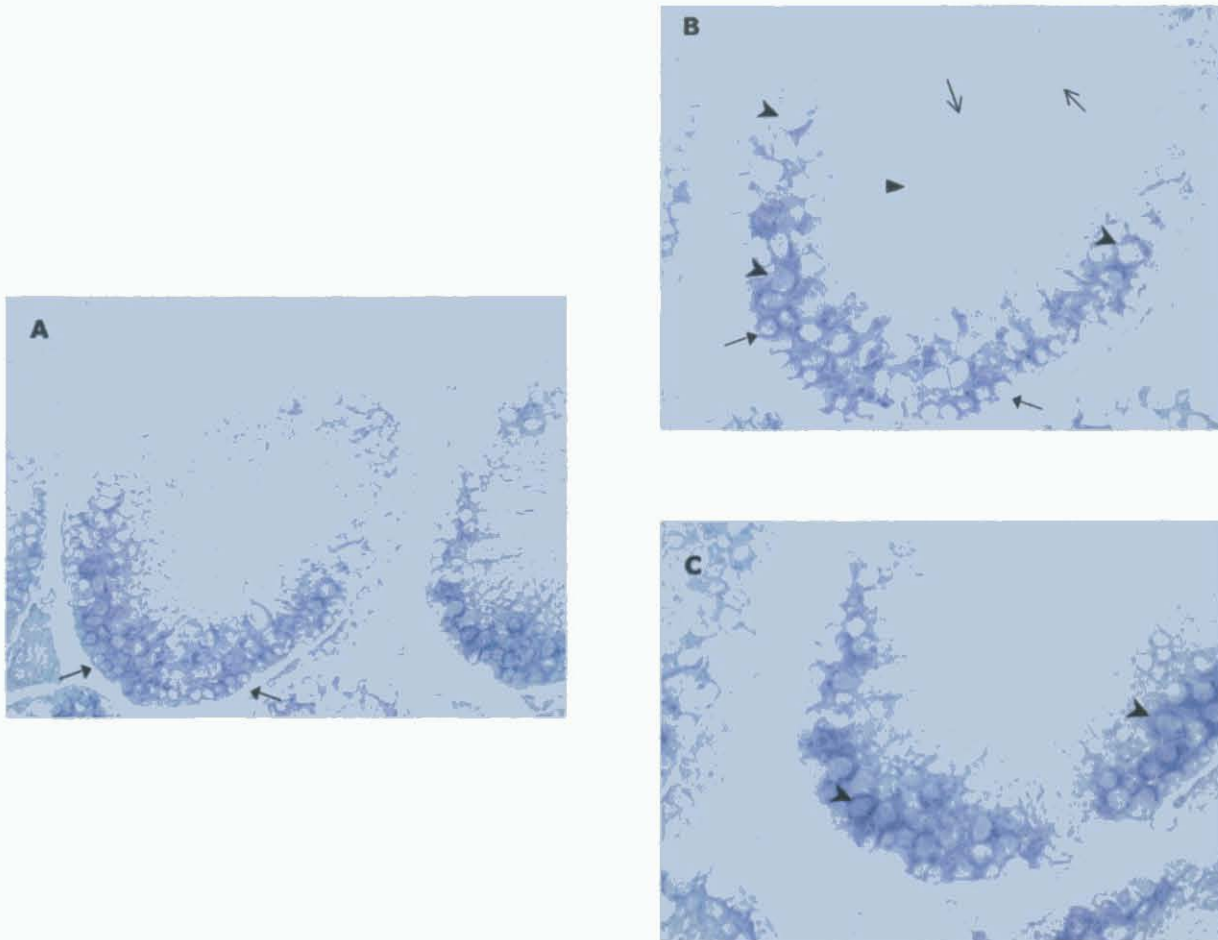


Figura 24. Hibridación *in situ* de *Pomt1* en criosecciones de testículo. (A, 40X; B y C 60X). Expresión de *Pomt1* en las espermatogonias (flechas cerradas, A y B), y en los espermatocitos primarios (puntas de flecha abiertas, B y C). Espermátidas en fase de maduración (flechas abiertas, B) y en espermatozoides maduros (punta de flecha, B).

fase de maduración y parece que ese no es el caso (Fig. 24B).

Con el objeto de determinar si la proteína se encontraba o no en este tejido, y para establecer la localización celular concreta, realizamos ensayos de inmunodetección mediante fluorescencia en secciones transversales de túbulos seminíferos. La sensibilidad del ensayo de *Western Blot* no nos había permitido detectar la proteína en extractos de membrana de testículo con el anticuerpo generado contra POMT1, pero en el ensayo de inmunofluorescencia indirecta, el anticuerpo fue capaz de localizar específicamente *Pomt1* en el acrosoma de las espermátidas en distintas fases de maduración: tanto en espermátidas redondas en fase de cubierta (Fig. 25A), como en en fase de elongación (fase

de acrosoma) (Fig. 25B), así como en espermátidas alargadas en fase de maduración (Fig. 25C y D).

La hibridación conjunta del anticuerpo anti-POMT1, junto con el marcador acrosómico PNA acoplado a un fluorocromo (FITC), corroboró la localización específica de POMT1 en el acrosoma de las espermátidas, ya que se observó una perfecta colocación de ambas proteínas tanto en espermátidas redondas (Fig. 26B) como en espermátidas en fase tardía de maduración (Fig. 27B). Una señal menos intensa de *Pomt1* se observó en las espermatogonias y espermatocitos primarios con respecto al control (Fig. 26B), pero parece que en estas células *Pomt1* estaba en el R.E., ya que se localizó de manera muy similar a como lo hacía el marcador de R.E. calnexina (Fig. 26C).

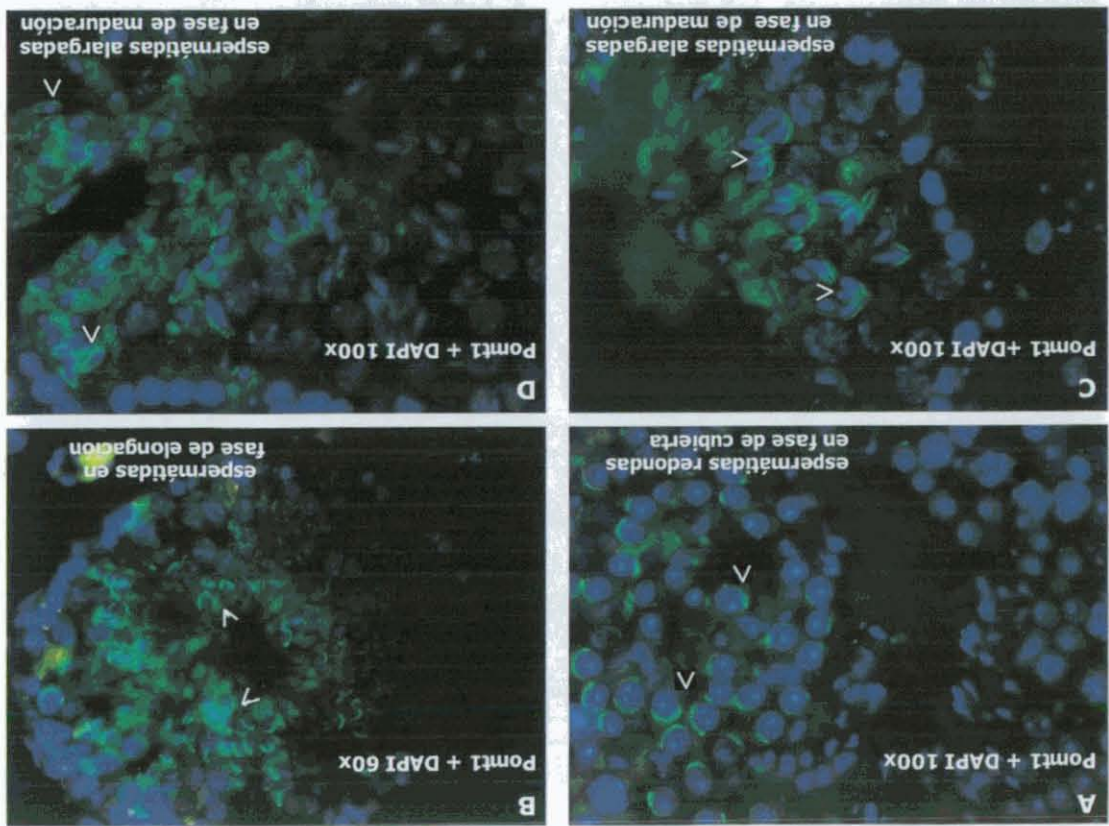


Figura 25. Inmunodetección de Pomt1 en criosecciones de testículo. Incubación con anti-Pomt1 (verde) y tinción posterior con DAPI (azul). Localización de Pomt1 en el acrosoma de las espermátidas en fase de maduración: espermátidas redondas en fase de cubierta (A), espermátidas alargadas en fase de acrosoma (B) y espermátidas alargadas en fase de maduración (C y D).

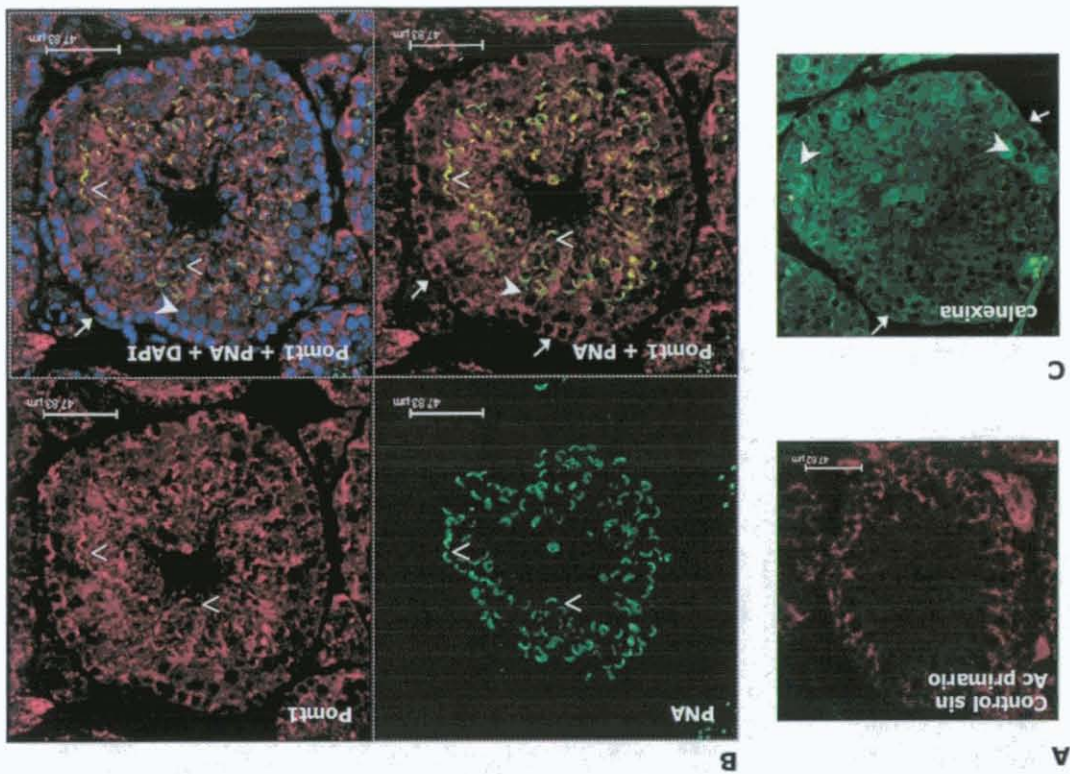


Figura 26. Inmunodetección de Pomt1 y PNA en criosecciones de testículo. (A) Control sin anticuerpo primario. (B) Incubación con anti-POMT1 (rojo) y tinción posterior con el marcador específico acrosomal PNA acoplado a un fluorocromo, FITC (verde) y DAPI (azul). Se muestra la superposición de Pomt1 y PNA con y sin DAPI. Localización de Pomt1 y PNA en el acrosoma las espermátidas redondas en fase de cubierta (puntas de flecha abiertas). (C) Incubación con el marcador de R.E. anti-calnexina (verde), que se localiza en el R.E. de todos los tipos celulares. (D) Localización de Pomt1 y PNA en el R.E. de las espermátidas (flechas) y los espermátocitos primarios (punta de flecha blanca).

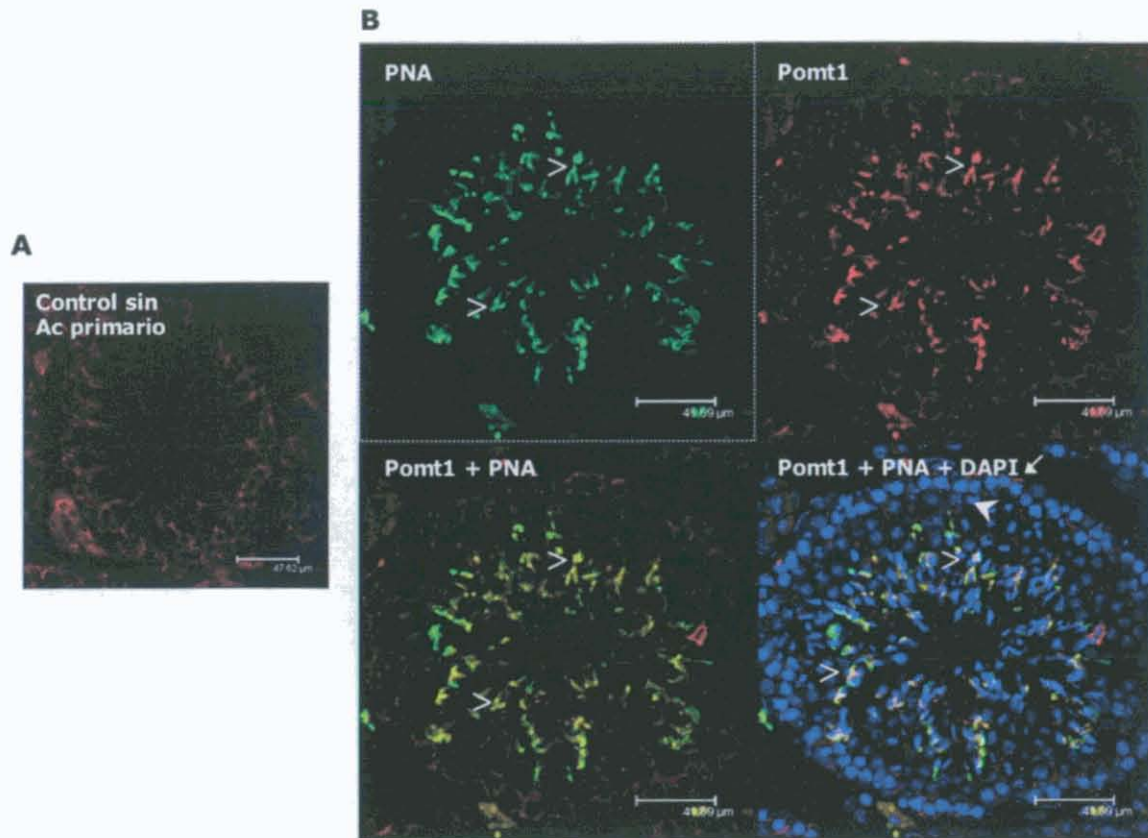


Figura 27. Inmunodetección de Pomt1 y PNA en criosecciones de testículo. (A) Control sin anticuerpo primario. (B) Incubación con anti-POMT1 (rojo) y tinción posterior con el marcador específico acrosomal PNA acoplado a un fluorocromo, FITC (verde) y DAPI (azul). Se muestra la superposición de Pomt1 y PNA con y sin DAPI. Localización de Pomt1 y PNA en el acrosoma de las espermatidas alargadas en fase de maduración (puntas de flecha abiertas), y localización de Pomt1 en el R.E. de espermatogonias (flecha blanca), y espermatoцитos primarios (punta de flecha blanca).

Estos datos parecen indicar que Pomt1 está relacionado directamente con la espermatogénesis, puesto que el mRNA se transcribe primero en las espermatogonias y espermatoцитos primarios, y la proteína se localiza después en el acrosoma de las espermatidas en todas sus fases de maduración.

Realizamos también ensayos de inmunodetección en secciones de testículo de ratón con el anticuerpo anti-Pomt2. Aunque la señal que detectamos era más débil que la correspondiente a Pomt1, Pomt2 se localizó en el acrosoma de las espermatidas en todas sus fases de diferenciación (*no se muestran los datos*). Nuestros datos coinciden con los datos publicados previamente (Willer *et al.*, 2003), y refuerzan la hipótesis de que ambas POMTs actúan en conjunción y comparten funcionalidad también en testículo.

3.7. En testículo, el principal sustrato de Pomt1 y Pomt2 se expresa únicamente en la membrana basal de los túbulos seminíferos

Por último, y dado que el α -dístroglicano es diana de O-manosilación de POMT1 y POMT2, debíamos determinar si existía relación entre las enzimas y el sustrato en este tejido. Estudios previos de inmunolocalización en testículo mostraban que las subunidades α y β del dístroglicano quedaban relegadas a las membranas basales de las paredes los túbulos seminíferos, compuestas de músculo liso. Aunque los anticuerpos con que se realiza estos estudios únicamente detectaban el “core” de la proteína y no los residuos glicosídicos (Durbeej *et al.*, 1998). Nuestros datos de *Western Blot* realizados en testículo con el anticuerpo VIA-4, parecían indicar que

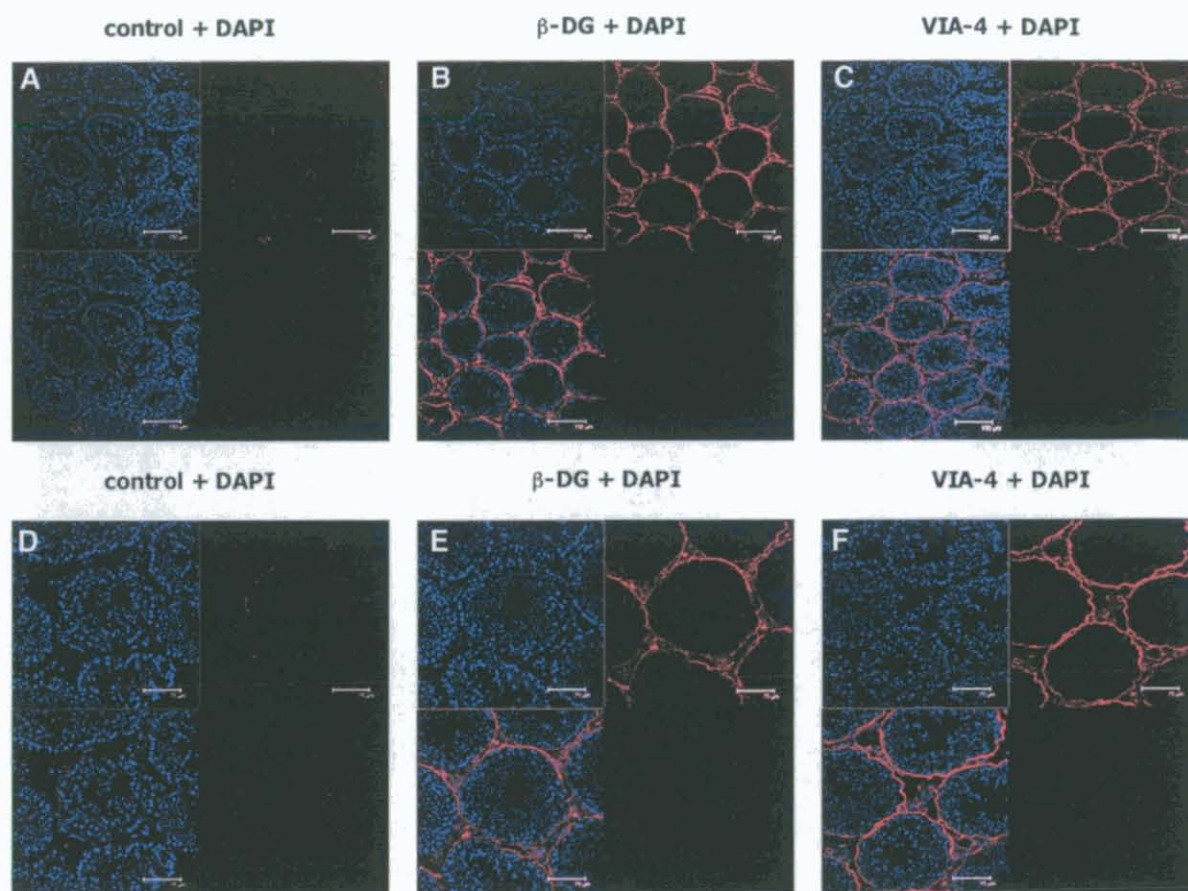


Figura 28. Inmunodetección de distroglicano en criosecciones de testículo. (A-C, 20X; D-F, 40X). Control sin anticuerpo primario (A y C). Incubación con anti β -distroglicano, β -DG (B y E) y anti- α -distroglicano, VIA-4 (C y F). Localización del distroglicano en las paredes de los túbulos seminíferos (B, C, E y F).

el α -distroglicano se encontraba muy poco glicosilado o al menos no a los niveles que otros tejidos (ver Fig. 19A). Para comprobar este hecho, realizamos inmunofluorescencia indirecta en secciones de túbulos seminíferos con los anticuerpos anti- β -DG y VIA-4. Nuestros resultados mostraron que el β -distroglicano se localiza en la membrana basal de los túbulos seminíferos (Fig. 28B y E) tal como se indicó anteriormente, y que la subunidad α se encuentra glicosilada como era de esperar ya que está formando parte de una membrana basal (Fig. 28C y F), si bien la glicosilación no debe alcanzar el grado suficiente para ser detectada mediante *Western Blot*. El distroglicano, al contrario que *Pomt1*, no se expresa en ningún tipo de célula germinal.

Estos resultados junto con los de la localización de *Pomt1* y *Pomt2* podrían indicar la existencia de algún posible nuevo sustrato de manosiación distinto al α -distroglicano las células germinales del

testículo, ya que el α -distroglicano no se encontró glicosilado en los mismos compartimentos donde se encontraban *Pomt1* y *Pomt2*.

4. GENERACIÓN Y ESTUDIO DEL RATÓN *KNOCKOUT* PARA EL GEN *Pomt1*

4.1. La pérdida de *Pomt1* provoca letalidad durante el desarrollo embrionario del ratón

La generación de animales *knockout* es una herramienta muy utilizada puesto que proporciona mucha información sobre la posible función de una proteína concreta. En nuestro caso, pretendíamos averiguar cómo afectaba la ausencia de O-manosilación en el ratón y obtener un modelo animal para el estudio de enfermedades neuromusculares como el WWS, que está provocado principalmente por mutaciones en el gen *POMT1* entre otros (van Reeuwijk *et al.*, 2005a). En este apar-

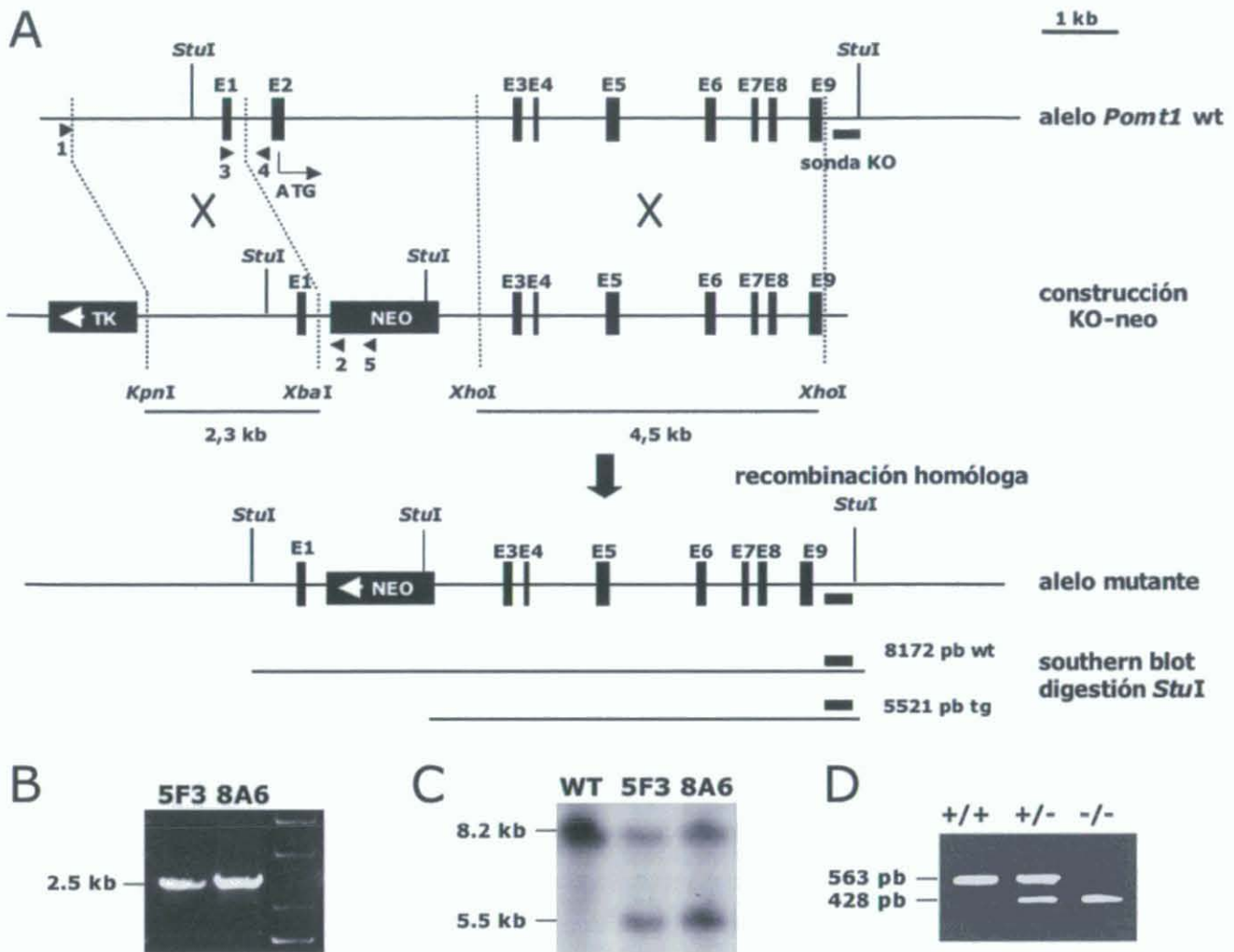


Figura 29. Eliminación dirigida del gen *Pomt1* mediante recombinación homóloga. (A) Representación esquemática de la estrategia de sustitución alélica, indicando el locus genómico, la construcción, y el alelo mutado de *Pomt1* esperado después de la recombinación homóloga. Marcadores de selección: timidina kinasa del virus *Herpes simplex* (TK) y neomicina (NEO). El brazo corto (2.3 kb) y el brazo largo (4.5 kb) de recombinación homóloga están indicados. Los cebadores de PCR están representados por puntas de flecha. (B) Los cebadores 1 y 2 se usaron para identificar una banda de 2.5 kb en el alelo mutado de dos clones de células ES: 5F3 y 8A6. (C) Southern Blot de DNA genómico de los clones recombinantes y un control *wt*. Las dianas de restricción *StuI* están indicadas. La sonda KO identifica un fragmento de 8.2 kb en el alelo *wt*, y otro de 5.5 kb en el alelo mutado. (D) Genotipado por PCR de embriones procedentes de distintos estadios de desarrollo. Los cebadores 3 y 4 identifican una banda de 563 pb en el alelo endógeno, mientras que los cebadores 3 y 5 identifican una banda de 428 pb en el alelo mutante.

tado, describimos las consecuencias de la eliminación dirigida de *Pomt1* mediante sustitución alélica.

La interrupción alélica del gen *Pomt1* se llevó a cabo sustituyendo el exón 2, que contiene el ATG iniciador, por un gen de resistencia a neomicina. La estrategia de sustitución se muestra en la figura 29A. La construcción con el gen modificado se introdujo en células ES 129/P20la (ver materiales y métodos) para que ocurriera recombinación homóloga entre el locus endógeno de *Pomt1* y el DNA modificado. Los clones resistentes, tanto a neomicina como a ganciclovir, fueron aislados, y de todos

ellos se extrajo DNA para su estudio. De un total de 480 clones analizados, sólo dos recombinaron correctamente (5F3 y 8A6), y fueron identificados por PCR y Southern Blot (Fig. 29B y C). Estos dos clones se inyectaron por separado en blastocistos BALB/c para generar quimeras, que transmitieron el alelo mutado de *Pomt1* a su progenie.

Los ratones heterocigotos *Pomt1*^{+/−} se desarrollaron y reprodujeron normalmente, sin mostrar problemas de fertilidad ni diferencias aparentes con respecto a los individuos *wt*. Al analizar el genotipo de la progenie de los ratones heterocigotos *Pomt1*^{+/−},

Tabla 1. Progenie y genotipado de embriones procedentes de diferentes cruces de heterocigotos.

estadio de desarrollo	total	Genotipo		
		+/+	+/-	-/-
ratones adultos	81	25 (31%)	56 (69%)	0
E10.5	38	15	23	0
E9.5	48	8	32	8*
E8.5	44	9	24	11*
E7.5	26	7	12	7*
E3.5 (blastocistos)	109	23	69	17

* A medida que avanza el desarrollo los mutantes *Pomt1* muestran un progresivo retraso en el desarrollo y posterior degradación.

sólo encontramos ratones *wt* y heterocigotos, y no apareció ningún ratón homocigoto *Pomt1*^{-/-}. La progenie resultó ser 31% homocigotos *wt* y 69% heterocigotos (Tabla 1), en una proporción aproximada de 1:2, lo que indicaba una herencia mendeliana típica de letalidad embrionaria.

Para determinar en que etapa concreta se producía la letalidad de los embriones homocigotos carentes de *Pomt1* se aislaron embriones de distintos estadios del desarrollo embrionario, antes y después de la implantación en el útero, que fueron genotipados mediante PCR (Fig. 29D). Los blastocistos (E3.5, embriones preimplantados) aislados de varias ratonas preñadas fueron genotipados. Se identificaron blastocistos homocigotos mutados en la proporción mendeliana esperada 1:2:1 (Tabla 1). Éstos presentaban un desarrollo trofoblástico normal y eran indistinguibles de los demás (*no se muestran los datos*). El genotipo de los embriones en estados más avanzados, de E7.5 a E9.5 reveló también una proporción 1:2:1 (Tabla 1), aunque los embriones *Pomt1*^{-/-} eran significativamente menores que los *wt* y se desorganizaban a medida que avanzaba el desarrollo (Fig. 30). Un ejemplo es que los embriones *Pomt1*^{-/-} aislados a día E8.5 mostraban un grado variable de anomalías morfológicas. Algunos parecían permanecer en el estadio de E6.5 típico de forma de huevo cilíndrico (Fig. 30 #1), otros avanzaban en el desarrollo, pero sufrían un bloqueo algo más tarde (Fig. 30 #2). Los embriones *Pomt1*^{-/-} terminaban siendo reabsorbidos durante la gestación, de modo que al llegar

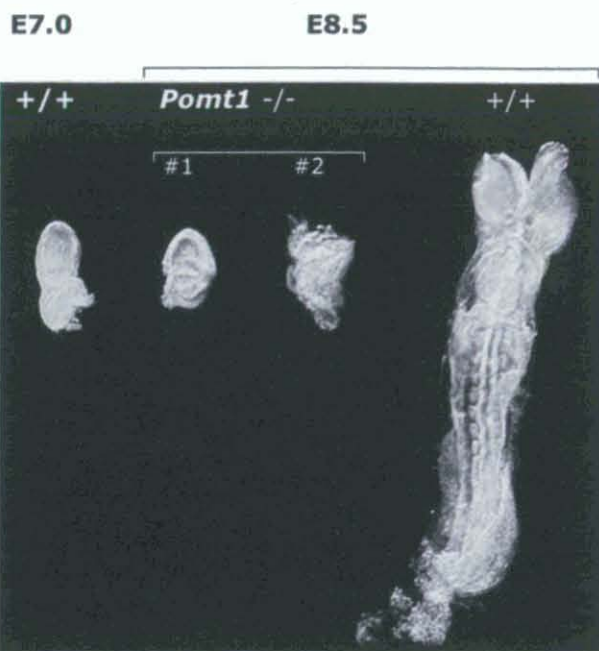


Figura 30. Morfología de los embriones *wild-type* y *Pomt1*^{-/-}. Imágenes de embriones procedentes de un cruce de ratones heterocigotos *Pomt1*^{+/-} a día E8.5. Los embriones carentes de *Pomt1* (#1 y #2) fueron confirmados por PCR. Se observa un retraso severo del crecimiento, probablemente debido a un bloqueo en el desarrollo entre E6 y E7. Para comparar el tamaño se muestra un embrión *wt* de E7.0.

a E10.5, prácticamente no quedaban restos de tejido de los embriones mutados (Tabla 1).

Todos estos resultados sugieren que la letalidad embrionaria parece deberse a un bloqueo en el desarrollo alrededor los estadios E6.5 y E7.5. La gastrulación parecía no estar afectada, ya que la hibridación *in situ* en embriones de E6.5 con un marcador de gastrulación (*brachyury*) no reveló ninguna anomalía (Willer *et al.*, 2004). Todo parece indicar que *Pomt1* juega un papel crucial durante la embriogénesis temprana del ratón.

4.2. La pérdida de *Pomt1* provoca la desorganización de la membrana de Reichert

Tal como se ha mencionado anteriormente, el α -dístroglicano es la única proteína sustrato de POMT1 que se conoce hasta la fecha. La glicosilación posttraduccional del α -dístroglicano, y más en concreto la adición de cadenas de O-manosilglicanos parece ser crítica a la hora de determinar sus propiedades de unión a ligando (Michele *et al.*, 2002; Michele and Campbell, 2003; Kim *et al.*, 2004).

En el ratón, el α -dístroglicano juega un papel importante en el ensamblaje de membranas basales, uniéndose a la laminina soluble y organizándola en la superficie celular. Es más, parece que esta unión es un requisito necesario para ensamblar correctamente los demás componentes de la matriz extracelular que forman parte de estas membranas (Henry and Campbell, 1998). La membrana de Reichert es una de las primeras membranas basales que se forman en el embrión. Su principal función consiste en actuar de barrera protectora permitiendo el paso de nutrientes al embrión (Salamat *et al.*, 1995).

Teniendo en cuenta estos datos, quisimos determinar si la glicosilación del α -dístroglicano podría verse afectada en los embriones carentes de *Pomt1*, para lo cual realizamos ensayos de inmunofluorescencia indirecta en secciones de embriones *Pomt1*^{-/-} de día E7.5. Los resultados mostraron que, en los embriones *wt* y heterocigotos, los anticuerpos específicos generados contra los residuos glicosídicos del α -dístroglicano (VIA4-1 y IIH6), reconocían principalmente la membrana de Reichert y algunas células maternas que rodeaban el embrión (Fig. 31A y B y no se muestran los datos). Por el contrario, estos

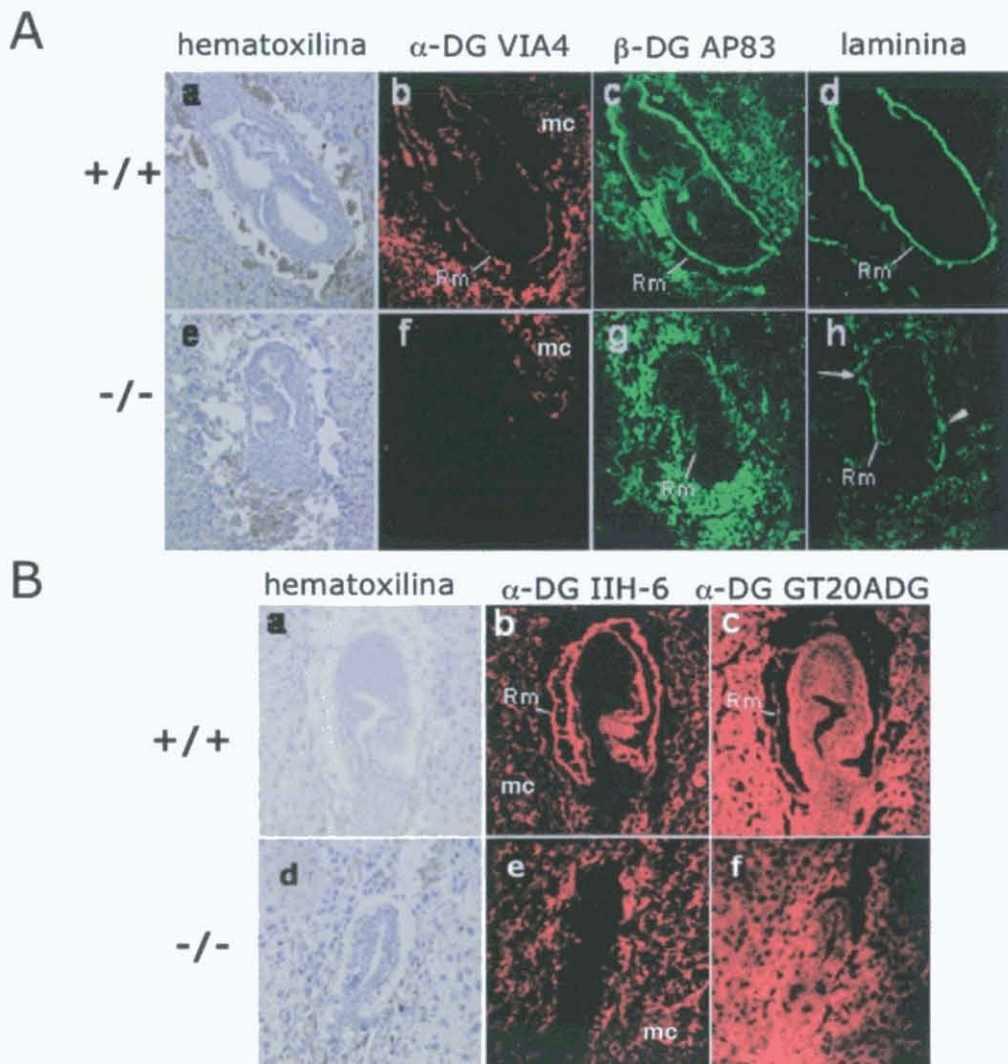


Figura 31. Inmunodetección de componentes de la matriz extracelular en embriones *Pomt1*^{-/-}. Secciones sagitales de embriones embebidos en parafina de E7.5 (A) o congelados de E6.5 (B). Tinción con hematoxilina e incubación con anticuerpos del α -dístroglicano que reconocen los glicopéptidos (VIA-4, IIH6) o el "core" de la proteína (GT20ADG), el β -dístroglicano (AP83), y la laminina. Se muestran embriones *wt* (A a-d y B a-c) y embriones mutados (A e-h y B d-f). En los embriones *Pomt1*^{-/-}, los glicopéptidos están ausentes en las estructuras derivadas del embrión, aunque están presentes en las células maternas (mc, *maternal cells*). Tinción discontinua (flechas) y parcheada (puntas de flecha) de la laminina en la membrana de Reichert (Rm *Reicherts' membrane*) de los embriones mutados.

glico-epítomos no se detectaron en la membrana de Reichert ni en el tejido embrionario de secciones de embriones *Pomt1*^{-/-} (Fig. 31A*f* y *Be*), aunque sí se detectaron en el tejido extraembrionario materno.

Estos resultados sugieren que, *in vivo*, POMT1 contribuye con la principal actividad manosiltransferasa requerida para la incorporación de O-manosilglicanos en el α -dístroglicano. La inmunofluorescencia con anticuerpos dirigidos contra las subunidades α y β del dístroglicano reveló una reducción de ambas proteínas en la membrana de Reichert de los embriones carentes de *Pomt1* (Fig. 31A, *c* y *g* y 31B, *c* y *f*). Esto podría indicar un incorrecto procesamiento y maduración, así como un fallo en el transporte del dístroglicano a la membrana debido a la hipoglicosilación. Se ha descrito que la incorrecta O-glicosilación del dístroglicano interfiere en el procesamiento del precursor de la proteína madura y reduce los niveles de dístroglicano en la superficie celular (Esapa *et al.*, 2003).

La ausencia de O-manosilglicanos y el nivel reducido de las subunidades α y β del dístroglicano podría afectar a la correcta distribución de la laminina, y en consecuencia, a la formación de membranas basales tales como la membrana de Reichert. Este hecho se observó en secciones de embriones *Pomt1*^{-/-} incubadas con el anticuerpo anti-laminina. La laminina se localizó perfectamente en la membrana de Reichert de los embriones *wt* (Fig. 31A*d*), mientras que en los embriones *Pomt1*^{-/-} los niveles de laminina estaban significativamente reducidos y su distribución se mostró desorganizada, volviéndose discontinua y en algunas zonas parcheada (Fig. 31A*h*).

En resumen, la interrupción dirigida del gen *Pomt1* en el ratón afectaba a la formación de membranas basales esenciales, que se manifestó con la desorganización de la membrana de Reichert y la posterior letalidad embrionaria. El fallo por parte de esta membrana de actuar como barrera protectora del embrión se reflejó en el hecho de que se encontraron células de la sangre maternas en el interior de los embriones carentes de *Pomt1* (*no se muestran los datos*).

5. GENERACIÓN DE RATONES QUIMERA A PARTIR DE CÉLULAS ES^{*Pomt1*^{-/-}}

5.1. Obtención de ratones quimera

Dado que la interrupción génica de *Pomt1* resultó ser letal durante la embriogénesis, nos planteamos otras estrategias para pasar esta barrera de letalidad, entre las que escogimos la generación de ratones quimera a partir de células ES^{*Pomt1*^{-/-}}, tal como se hiciera anteriormente con la fukutina, putativa glicosiltransferasa implicada en el desarrollo de enfermedades neuromusculares (Takeda *et al.*, 2003). Estos ratones nos proporcionarían información de las consecuencias de la pérdida de *Pomt1* en ciertos tejidos, dependiendo del grado de contribución de células mutadas a los mismos, aunque esa contribución escapase a nuestro control. Asimismo, el grado de quimerismo indicaría cual es el porcentaje de *Pomt1* mutado necesario para que se produzca un fenotipo anormal.

La producción de células ES mutadas en ambos alelos de *Pomt1* resultaría fácil y de rápida obtención, ya que disponíamos de los clones de células ES^{*Pomt1*^{-/-}} utilizados en la generación del ratón *knockout* convencional. Únicamente necesitábamos que el segundo alelo mutado tuviese un gen de resistencia distinto a la neomicina para poder seleccionar los clones que incorporasen la nueva mutación.

La interrupción de un segundo alelo de *Pomt1* se realizó en el clon de células ES^{*Pomt1*^{-/-}} 5F3, y se llevó a cabo mediante la estrategia mostrada en la figura 32A, por la cual un gen de resistencia a puromicina, sustituye el exón 2 con el ATG iniciador en el alelo *wt* restante de las células del clon 5F3, que ya tenía mutado uno de los alelos de *Pomt1* (*ver figura 29A*). El clon recombinante tendría mutados ambos alelos de *Pomt1*, al sustituirse ambos exones 2 por sendos genes de resistencia a neomicina y puromicina, respectivamente. La construcción pKO-puro se introdujo en células ES E14.1 del clon 5F3 (derivadas de la cepa 129/P201a), de la misma forma que se hiciera anteriormente con la construcción pKO-Neo. Los clones resistentes a neomicina, puromicina y ganciclovir fueron aislados para obtener DNA genómico.

Se analizaron un total de 240 clones, de los cuales un único clon (2C10) fue identificado mediante PCR. Este clon fue confirmado como positivo para la recombinación homóloga en el alelo *wt* mediante análisis de *Southern Blot* de DNA digerido con *StuI* (Fig 32B y C).

Puesto que muchos de los clones resistentes a las drogas no contienen los genes propios de selección, es decir son falsos positivos, y para descartar que la recombinación homóloga hubiese tenido lugar en el alelo mutado, se comprobó mediante PCR que este clon mantenía ambos genes de resistencia a neomicina y puromicina, respectivamente (Fig. 32B).

Una vez realizadas todas las comprobaciones, el clon 2C10 fue utilizado en varias rondas de microinyección en blastocistos BALB/c para la generación de quimeras.

De la primera microinyección del clon 2C10 resultaron 9 quimeras, de las cuales 1 murió al nacer (nº 1) y otra a los 9 días (nº 2), ambas sin fenotipo anormal aparente. Las quimeras se clasificaron como de bajo o medio grado de quimerismo según el color del pelo (no se obtuvieron quimeras de alto grado de quimerismo). De las dos quimeras que murieron no se pudo hacer esta clasificación. El grado de quimerismo se confirmó analizando la contri-

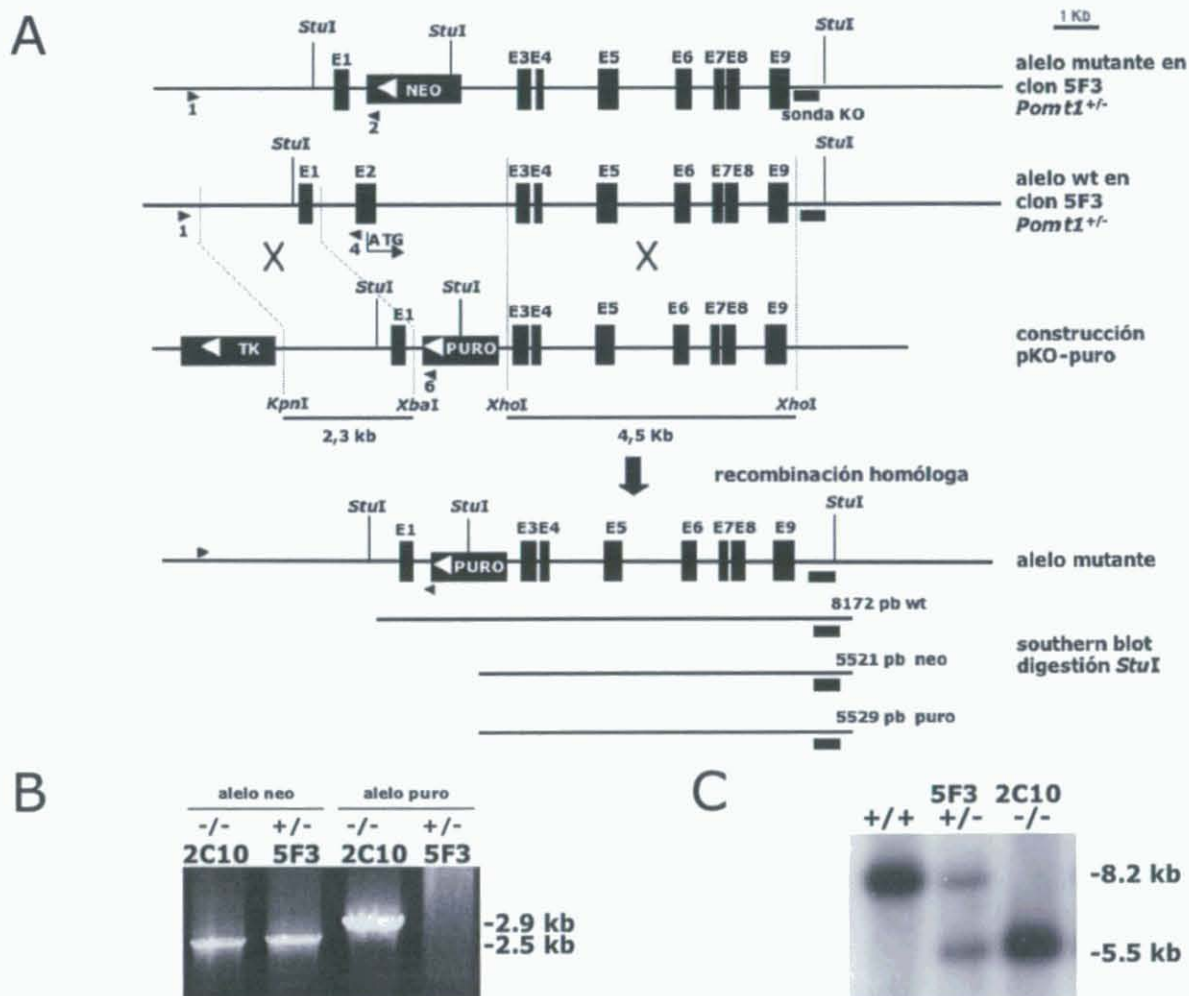


Figura 32. Eliminación dirigida del segundo alelo del gen *Pomt1* mediante recombinación homóloga. (A) Representación esquemática de la estrategia de sustitución alélica. Están indicados el locus genómico del clon 5F3 con los alelos mutado y *wt*, la construcción, y el segundo alelo mutado de *Pomt1* esperado después de la recombinación homóloga. Marcadores de selección: timidina kinasa del virus *Herpes simplex* (TK), neomicina (NEO) y puromicina (PURO). El brazo corto (2,3 kb) y el brazo largo (4,5 kb) de recombinación homóloga están indicados. Los cebadores de PCR están representados por puntas de flecha. (B) Los cebadores 1 y 2 se usaron para amplificar una banda de 2,5 kb y comprobar que se mantenía el alelo NEO. Los cebadores 1 y 6 se usaron para identificar una banda de 2,9 kb en un clon positivo para la segunda recombinación homóloga: 2C10. (C) *Southern Blot* de DNA genómico de los clones recombinantes 2C10 (-/-), 5F3 (+/-) y un control *wt*. Las dianas de restricción *StuI* están indicadas. La sonda KO identifica un fragmento de 8,2 kb en el alelo *wt*, y otro de 5,5 kb en los alelos mutados (NEO y PURO).

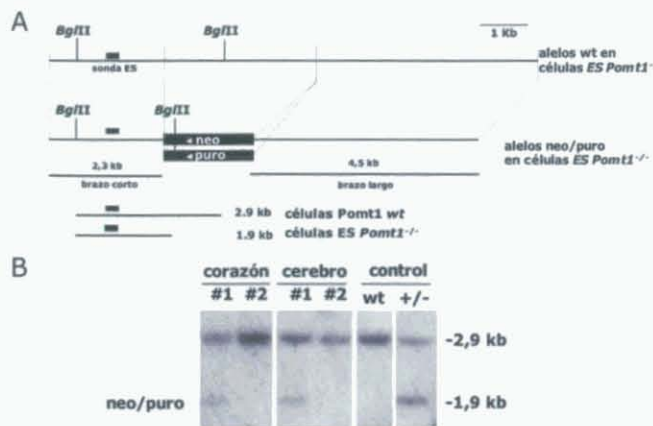


Figura 33. Determinación del grado de quimerismo. (A) Representación esquemática de la estrategia utilizada para determinar el porcentaje de quimerismo de células ES en tejidos. Los alelos de las células endógenas *wt* y los alelos neo/puro de células mutadas para el gen *Pomtl* están indicados. (B) Southern Blot de DNA genómico de corazón y cerebro de las quimeras n° 1 y n° 2. Las dianas de restricción *BglII* están indicadas. La sonda ES identifica un fragmento de 2,9 kb en células con el gen *Pomtl* intacto, y un fragmento de 1,9 kb en células procedentes de células *ES^{Pomtl}*. La quimera n° 1 presenta un porcentaje del 50% de quimerismo, mientras que la n° 2 parece ser *wt*.

bución de células *ES^{Pomtl}* en los principales tejidos, mediante Southern Blot de DNA genómico digerido con *BglII*. Este DNA se hibridó con una sonda capaz de discriminar entre células del individuo receptor y células originadas a partir de las células ES mutadas. Un esquema de la estrategia se muestra en el esquema de la figura 33A.

Cuando se extrajeron los tejidos de la quimera n° 1 ya había comenzado a ocurrir autólisis en los mismos, de modo que sólo se consiguió extraer DNA del cerebro y el corazón en buenas condiciones. Los resultados del ensayo de Southern Blot indicaron que la quimera n° 1 presentaba un grado medio de quimerismo, ya que aproximadamente el 50% de las células de ambos tejidos procedían de células *Pomtl*^{-/-}, frente al 50% restante de tipo *wt*. La quimera n° 2 no presentó contribución de células *Pomtl*^{-/-} aparente en estos dos tejidos, ni en tejidos adicionales como la piel, el músculo esquelético, el hígado o el riñón (Fig. 33B y *no se muestran los datos*). Esta podría explicarse porque durante la implantación, para obtener un mayor éxito de gestación en las hembras receptoras, se transfirieron algunos blastocistos *wt* junto a los blastocistos mi-

croinyectados (*ver materiales y métodos*), pudiendo provenir este ratón de blastocistos *wt*.

De las 7 quimeras restantes, cuatro machos y tres hembras, los machos fueron sacrificados por error, y de las tres hembras (n° 3, n° 4 y n° 5) solo la quimera n° 3 mostró variaciones visibles del color del pelo, y fue clasificada como de bajo grado de quimerismo (Fig. 34A).

Las quimeras n° 3, n° 4 y n° 5 fueron sacrificadas a los 10 meses de edad y se les extrajo DNA de los principales tejidos: músculo esquelético, corazón, cerebro, hígado, riñón y piel para determinar el porcentaje de contribución de células *ES^{Pomtl}*.

Los resultados determinaron que las quimeras n° 4 y n° 5 no mostraban quimerismo alguno; debió tratarse de individuos *wt* procedentes de blastocistos *wt*. La quimera n° 3 por el contrario, mostró un porcentaje de quimerismo muy similar en todos los tejidos analizados, e inferior al 50%, excepto en el hígado, donde el porcentaje de quimerismo parecía ser algo mayor del 50% (Fig. 34C). Por lo tanto, se confirmaba que la clasificación con respecto al color del pelo era acertada. El fenotipo que mostraban estos ratones no tenía porqué diferir del de los ratones *wt* o heterocigotos para el gen *Pomtl*, puesto que en sus principales tejidos la cantidad de *Pomtl* *wt* con respecto a la mutada es suficiente para llevar a cabo la función de manosiación necesaria en cada caso.

5.2. Los ratones con grado medio de quimerismo mostraron una apariencia y comportamiento normales

Las quimeras fueron sometidas a ensayos de capacidad motora en el Rota-rod, a estudios de audición (ABR) y a pruebas de imagen mediante resonancia magnética nuclear (MRI). Todos estos estudios determinaron que la quimera de bajo grado de quimerismo mostró un comportamiento y apariencia muy similar al de individuos normales, coincidiendo con el fenotipo observado en los ratones heterocigotos del *knockout* convencional.

Así, en el test del Rota-rod realizado a los 6 meses de edad, las quimeras permanecían sobre la barra del Rota-rod más o menos el tiempo que el ratón *wt*, aun-

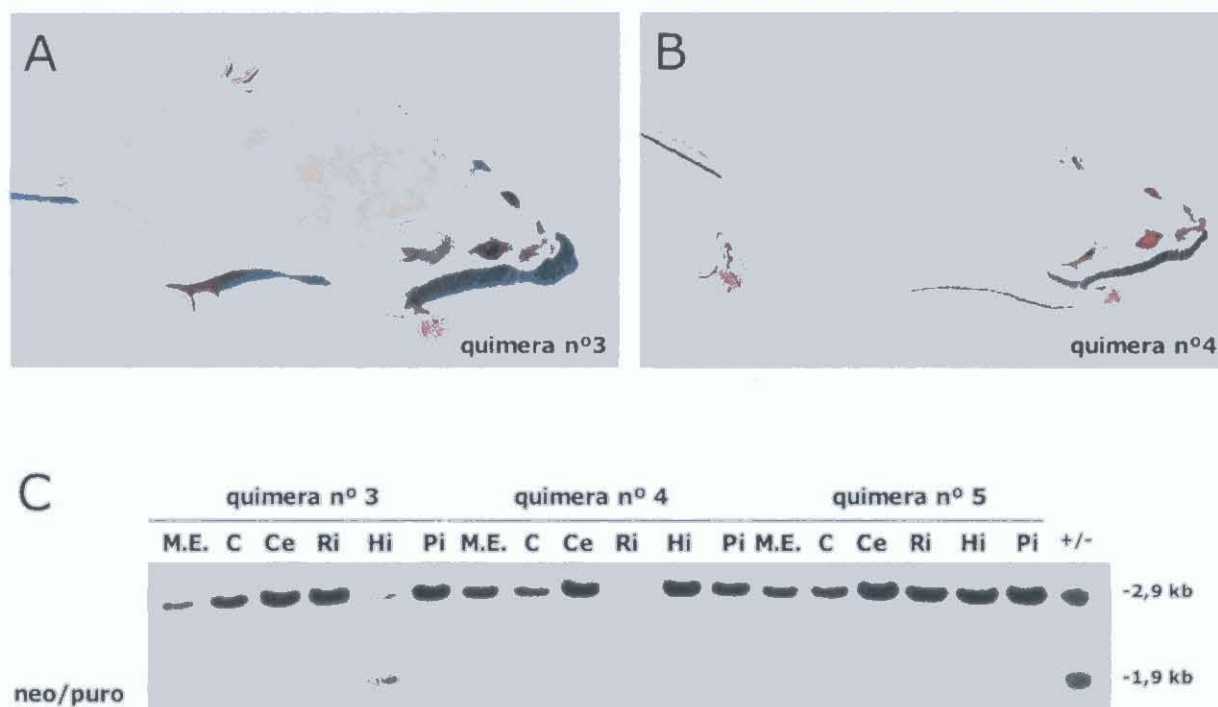


Figura 34. Determinación del grado de quimerismo de las quimeras nº 3, nº 4 y nº 5. (A) Imagen de la quimera nº 3 con distintos tonos de color de pelo. (B) Imagen de la quimera nº 4 sin diferencia apreciable en el color de pelo. (C) Southern Blot de DNA genómico de distintos tejidos de las tres quimeras. M.E: músculo esquelético; Co: corazón; Ce: cerebro; Ri: riñón; Hi: hígado; Pi: piel. La sonda ES identifica un fragmento de 2,9 kb en células del gen *Pomt1* intacto, y un fragmento de 1,9 kb en células procedentes de células ES. Sólo la quimera nº 3 presentó un porcentaje de quimerismo algo menor del 50% en todos los tejidos excepto en hígado, donde parecía ser algo mayor del 50%.

que la quimera nº 3 y la nº 5 caían antes (Fig. 35A). A los 9 meses, todas las quimeras se comportaban prácticamente como el wt aunque la quimera 3 permanecía algo menos tiempo que las demás (Fig. 35B). Apparently la quimera nº 3 no mostraba ningún indicio de distrofia muscular, únicamente pesaba algo más que sus compañeras (ver Fig. 34A), pudiendo ser este el motivo por el que caía antes que las otras.

El test de respuesta auditiva del tallo cerebral (ABR, *auditive brainstem response*) consiste en presentar estímulos auditivos en forma de *click* que activan las neuronas del receptor auditivo u órgano de Corti a distintos niveles de intensidad que generan respuestas o potenciales evocados auditivos. La curva promedio de respuestas que se obtiene presenta 5 picos característicos. El umbral de audición de un ratón es el nivel de intensidad menor al que se distinguen estos 5 picos. Los ensayos de ABR mostraron que los ratones quimera presentaban un umbral auditivo de 25-30 dB, igual al que presentaban los

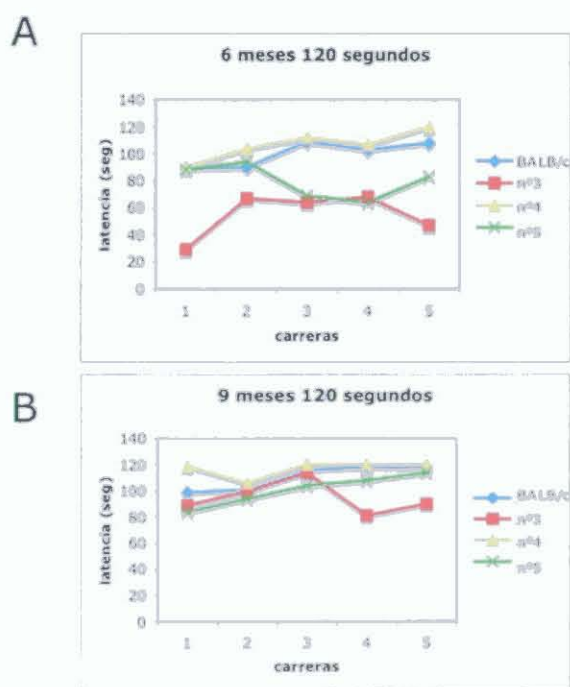


Figura 35. Test del Rota-rod en ratones quiméricos. Test realizado a los 6 meses (A) o a los 9 meses de edad (B). Las quimeras se comportaron, en general, como el control BALB/c (azul), excepto la quimera nº 3 (rojo) que caía antes que las demás.

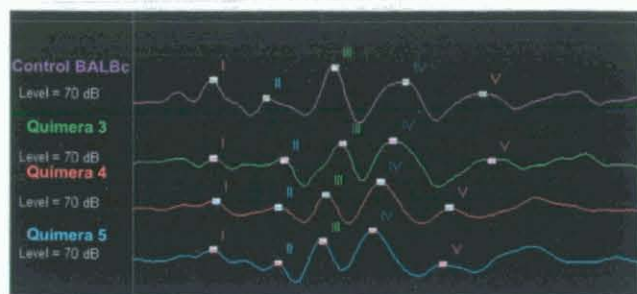


Figura 36. Test ABR "auditory brainstem response". Esquema comparativo de los potenciales evocados en forma de 5 picos desde el comienzo de la señal auditiva a 70 dB. Están representados los potenciales evocados del control BALB/c y de las quimeras n° 3, 4 y 5.

ratones *wild-type*. Ningún ratón quimérico resultó tener mermada su capacidad auditiva, ya que la curva promedio de cinco picos era muy similar en todos los ratones. Un ejemplo de la comparativa de curvas de respuestas generadas a 70 dB se muestra en la Figura 36.

La imagen por resonancia magnética de los ratones quimera no mostró diferencias con respecto a las imágenes tomadas en los ratones *wild-type* (no se muestran los datos).

Todos estos datos indican que, para poder mermar la capacidad enzimática de *Pomt1*, es necesario obtener un porcentaje mayor de contribución de células *ES^{Pomt1}* en cada tejido.

6. GENERACIÓN DEL RATÓN *KNOCKOUT* CONDICIONAL PARA EL GEN *Pomt1*

6.1. Obtención de clones recombinantes con tres elementos *loxP*

La estrategia de sustitución alélica para generar el ratón *knockout* condicional de *Pomt1* se muestra en la Figura 37. La construcción pKOc contiene tres elementos *loxP*,

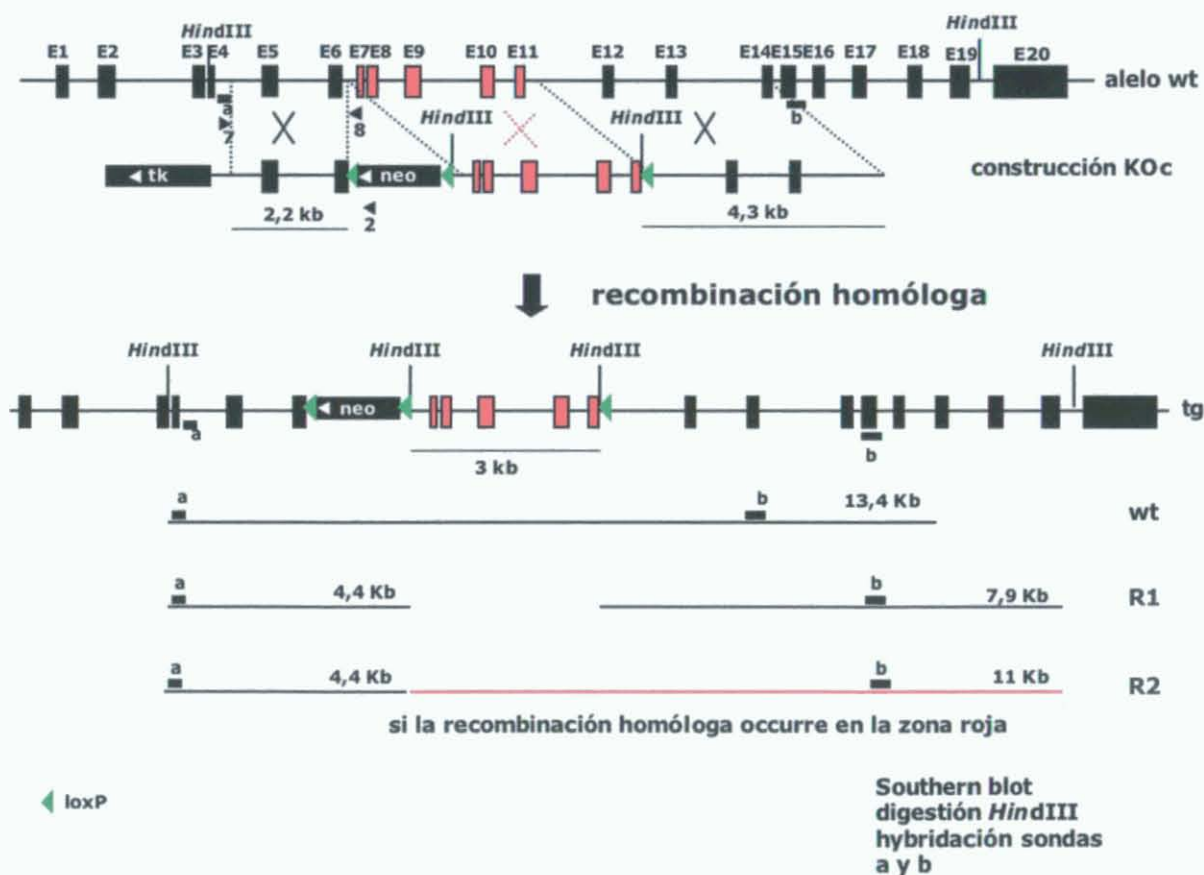


Figura 37. Representación esquemática de la estrategia de sustitución alélica con la introducción de elementos *loxP* en el alelo *Pomt1* mediante recombinación homóloga (tg). Están indicados el locus genómico de *Pomt1*, la construcción y el alelo mutado de *Pomt1* esperado después de la recombinación homóloga (tg). Marcadores de selección: timidina kinasa del virus *Herpes simplex* (TK), y neomicina (NEO). El brazo corto (2,2 kb) y el brazo largo (4,3 kb) de recombinación homóloga están indicados. En la zona de color rojo, la recombinación homóloga también puede tener lugar. Los cebadores de PCR están representados por puntas de flecha. Las dianas de restricción *HindIII* están indicadas. Las sondas a y b identifican un fragmento de 13,4 kb en el alelo *wt* y dos fragmentos de 7,9 kb y 4,4 kb en el alelo donde ocurra la recombinación homóloga deseada (R1). La sonda b también identifica una banda de 11 kb si la recombinación ha tenido lugar en la zona no esperada (en rojo, R2).

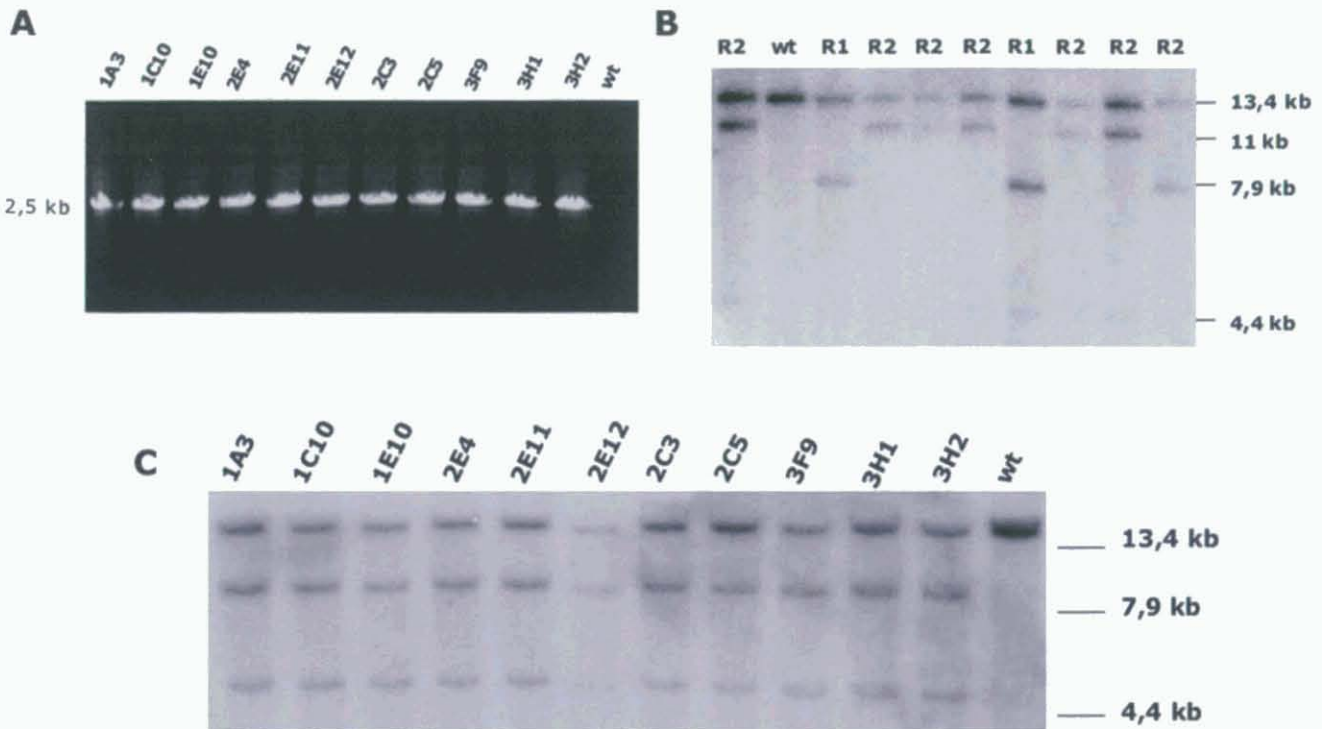


Figura 38. Rastreo de clones recombinantes del *knockout* condicional de *Pomt1*. (A) PCR de clones recombinantes y un control negativo wt con los cebadores 2 y 7 que amplifican un fragmento de 2,5 kb. (B) *Southern Blot* de clones recombinantes en el que se muestran los distintos tipos de recombinación. Si ocurre de la manera esperada (R1), las sondas a y b reconocen un fragmento de 13,4 kb en el alelo endógeno y otras dos de 7,9 kb y 4,4 kb en el alelo mutado. Si ocurre de manera no deseada (R2), las sondas a y b reconocen un fragmento de 13,4 kb en el alelo wt y otras dos de 11 kb y 4,4 kb en el alelo mutado. (C) *Southern Blot* de once clones recombinantes en los que la recombinación homóloga ha tenido lugar de la manera esperada.

dos flanqueando un gen de resistencia a neomicina (*“floxed neo”*), y un tercer elemento loxP situado 3 kb hacia la zona 3' de *Pomt1*. Cuando el DNA exógeno recombina de la manera esperada con el de las células ES (R1), se insertan el gen *“floxed neo”* y el tercer elemento loxP. Dado que el brazo largo de homología contiene el tercer elemento loxP que sólo representa 34 pares de bases, la zona de recombinación homóloga comprende unas 7,3 kb, y la recombinación podría ocurrir en cualquier punto hacia 5' antes de ese elemento loxP (R2, zona roja en la figura 37). Este elemento loxP se marcó con una diana de restricción (*HindIII*) para poder determinar mediante *Southern Blot* que la recombinación homóloga ha ocurrido en la zona esperada.

El plásmido pKOc fue introducido en células ES E14.1 para que tuviese lugar la recombinación homóloga. Los clones resistentes a neomicina fueron aislados para obtener DNA. Se analizaron un total de 600 clones, de los cuales 25 resultaron positivos en el análisis mediante PCR (Fig. 38A y no se mues-

tran los datos), que determina que la recombinación homóloga ha tenido lugar por la zona del brazo corto. Esos 25 clones fueron analizados por *Southern Blot* y mostraron los dos tipos de recombinación (R1 y R2). 11 clones recombinaron por la zona hacia 5' del tercer elemento loxP y fueron descartados. Los otros 14 recombinaron de la manera esperada, de modo que el alelo recombinante presentaba el gen *“floxed neo”* y un tercer elemento loxP a 3 kb (Fig. 38B y no se muestran los datos). Once de los clones que recombinaron correctamente fueron analizados por segunda vez para descartar falsos positivos y fueron confirmados mediante el análisis de PCR y *Southern Blot* (Fig. 38A y C).

Se escogieron dos clones para ser transfectados transitoriamente con un plásmido que expresa la recombinasa CRE. Los clones se crecieron en medio sin selección. Se han aislado 400 clones, de los que se ha extraído DNA para su estudio. Nos encontramos en este paso, a la espera de analizar los clones recombinantes.

6.2. La obtención del ratón *Pomt1*^{loxP/loxP} es el paso previo a la obtención del *knockout* condicional que ayudará a estudiar la función de *Pomt1* en cada tejido

La recombinasa CRE puede dar lugar a tres tipos de recombinación distintos, ya que existen tres elementos loxP: uno delecionaría el gen de resistencia a neomicina, otro el fragmento de *Pomt1* y el tercero ambos genes. En este paso seleccionaríamos los recombinantes (tipo I), carentes del gen *neo* y que mantuviesen el fragmento de *Pomt1* que se quiere eliminar flanqueado por dos elementos loxP (Fig. 39). La estrategia para comprobar que el gen *neo* se ha eliminado, mediante *Southern Blot* y PCR, se muestra en la figura 40. Tanto los clones recombinantes de tipo Ia como Ib serían válidos para conti-

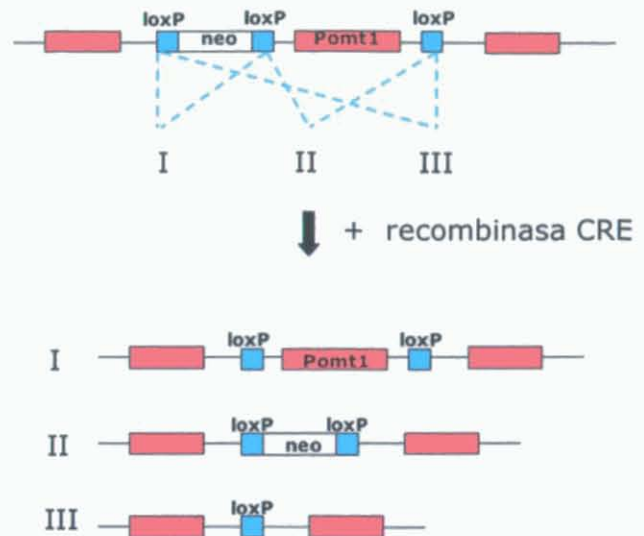


Figura 39. Esquema representativo de los tipos de recombinación CRE-loxP. Tipo I, eliminación del gen de selección NEO. Tipo II, eliminación del fragmento *Pomt1*. Tipo III, eliminación tanto del gen de selección como del fragmento *Pomt1*.

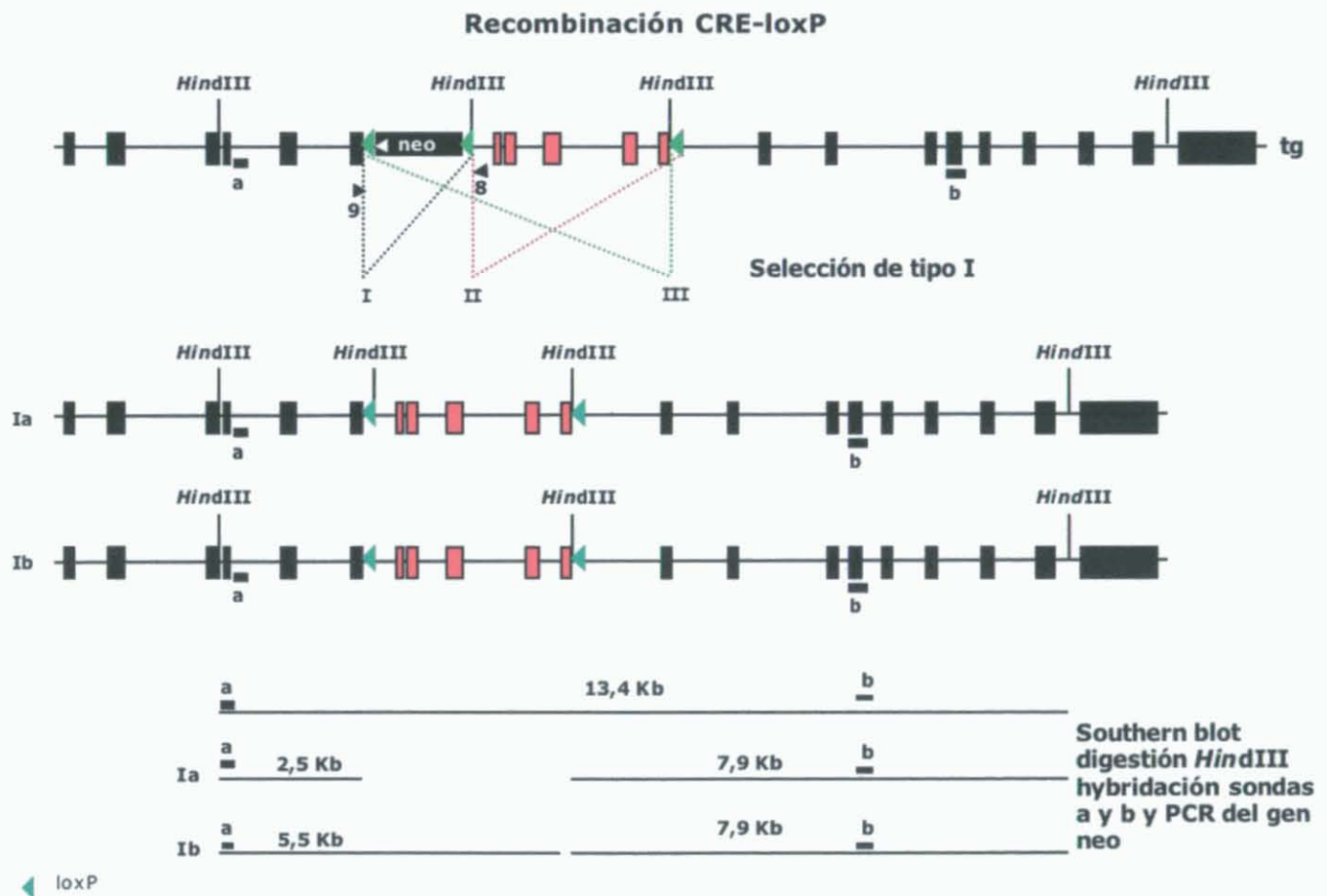


Figura 40. Recombinación CRE-loxP. Esquema representativo del tipo I de recombinación CRE-loxP (sin gen de selección) en los clones donde ha ocurrido la recombinación homóloga. Tipo Ia, si después de la recombinación queda el elemento loxP marcado con HindIII: las sondas a y b reconocen un fragmento de 13,4 kb en el alelo endógeno y dos de 2,5 kb y 7,9 kb en el alelo modificado. Tipo Ib, si después de la recombinación queda el elemento loxP que no está marcado con HindIII: las sondas a y b reconocen un fragmento de 13,4 kb en el alelo wt y dos de 5,5 kb y 7,9 kb en el alelo modificado. La eliminación de gen de selección se analiza también mediante PCR con los cebadores 8 y 9, que diferirán con el fragmento wt en 34 pb del loxP que quede.

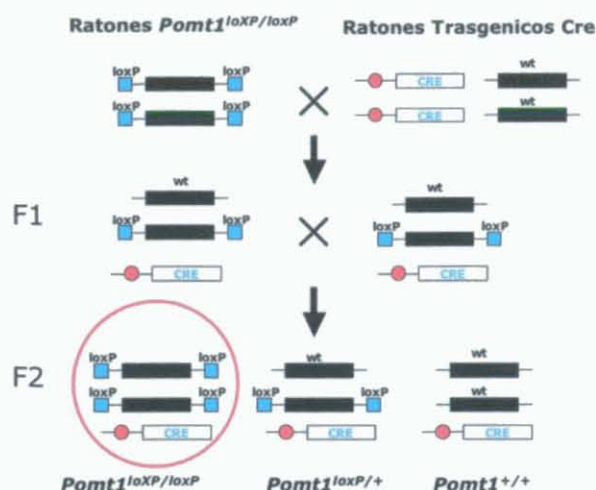


Figura 41. Estrategia de cruce de ratones homocigotos *Pomt1*^{loxP/loxP} con ratones transgénicos CRE. Resultado de la F1: ratones *Pomt1*^{loxP/+};CRE. Resultado de la F2: ratones *Pomt1*^{loxP/loxP};CRE, *Pomt1*^{loxP/+};CRE, o ratones *Pomt1*^{+/+};CRE. Para que la eliminación de *Pomt1* sea efectiva y produzca un fenotipo anormal, ambos alelos de *Pomt1* han de tener elementos *loxP*.

nuar con el siguiente paso, ya que en ambos el gen de selección *neo* se habría eliminado.

Los recombinantes deseados se introducirán en blastocistos, y se transferirán a una hembra receptora para generar quimeras que transmitan la alteración a la línea germinal. Estas quimeras, al cruzarse con ratones

wt, darán lugar a ratones heterocigotos *Pomt1*^{loxP/+}, que se cruzarán entre sí para obtener individuos homocigotos *Pomt1*^{loxP/loxP}.

A diferencia de los homocigotos *Pomt1*^{-/-}, éstos no tendrán interrumpido el gen. Únicamente tendrán dos elementos *loxP* de 34 pb (en zonas intrónicas), flanqueando una región que se eliminará cuando se exprese la recombinasa CRE. Esta región en el gen *Pomt1* constituye una zona esencial para la proteína, ya que comprende el dominio transmembrana V y parte del “loop” 5 (ver Fig. 2). Esta eliminación se consigue haciendo cruces con ratones transgénicos que expresen CRE bajo el control de un promotor inducible o específico de tejido. De esta forma, los ratones se desarrollarán normalmente y controlaremos el momento y/o el lugar donde eliminar un fragmento esencial de *Pomt1*, que impedirá que la proteína sea funcional. La estrategia de cruce se muestra en la figura 41. Para poder obtener datos del fenotipo que produzca la eliminación de *Pomt1* de manera condicional, los dos alelos del gen habrán de ser eliminados, de lo contrario no observaremos ningún fenotipo aparente, ya que como sabemos, los ratones heterocigotos para el gen *Pomt1* son perfectamente viables y fértiles.

DISCUSIÓN

Existe un grupo de distrofias musculares congénitas en humanos producidas por mutaciones en proteínas relacionadas con la síntesis de O-manosilglicanos. Mutaciones en el gen *POMT1*, entre otros genes relacionados con la O-glicosilación del α -dístroglicano, son responsables del síndrome de Walker-Warburg, una CMD muy heterogénea que presenta malformaciones oculares y cerebrales graves. Los pacientes con WWS muestran hipoglicosilación del α -dístroglicano, que deja de actuar como nexo de unión entre los componentes del citoesqueleto y la matriz extracelular en músculo y neuronas, dando lugar a distrofia muscular y defectos en la migración neuronal. Las mutaciones encontradas en los genes que provocan en este síndrome sólo representan un tercio de los casos de WWS (van Reeuwijk *et al.*, 2005a).

POMT1 es una manosiltransferasa que inicia la O-manosilación del α -dístroglicano. Hasta el momento, el α -dístroglicano es la proteína O-manosilada mejor estudiada, y la única diana de manosilación que se conoce de *POMT1*, aunque también se ha descrito O-manosilación en proteoglicanos cerebrales (Endo, 2004).

Previamente en el laboratorio se había realizado el rastreo de una genoteca de músculo esquelético con el objeto de encontrar posibles dianas de manosilación de *POMT1*. Se detectaron varias proteínas de interacción con *POMT1* humano (*sin publicar*). En este rastreo, uno esperaría encontrar interacción con el dístroglicano. Éste no fue el caso, y no resulta extraño, ya que los clones de la genoteca de cDNA están generados a partir de colas de oligo dT. Por tanto, muchas de las proteínas de fusión corresponden a secuencias 3' no traducidas (3' UTR) en el gen original. En los genes humanos, las

regiones 3' UTR suelen ser muy largas. Este hecho ocurre en el dístroglicano, cuya secuencia 3' UTR es de 3 kb. Además, la parte final de la proteína (más cercana a la 3' UTR) corresponde al β -dístroglicano, mientras que la región de glicosilación del α -dístroglicano estaría muy alejada del extremo 3' de su mRNA. Es bastante poco probable que existan clones en esta genoteca con el CDNA completo del dístroglicano. Por este motivo enfocamos el estudio hacia un ensayo de doble híbrido dirigido. En este sistema, dado que *POMT1* posee 7 dominios transmembrana, no pudimos hacer el ensayo de interacción con la proteína entera, puesto que los dominios hidrofóbicos impedirían el paso al núcleo. Por ello, se utilizaron las zonas hidrofílicas de *POMT1*, pero no se detectó interacción con el dístroglicano. No sabemos qué conformación tridimensional están adoptando las proteínas de fusión que se han construido, y desde luego, no tendrá nada que ver el tipo de plegamiento de estos fragmentos con el de la proteína nativa. También, puede que la reacción enzima-sustrato no sea lo suficientemente estable en el tiempo para poder ser detectada con este sistema, y es más que probable que requiera de la ayuda de otros muchos factores que se hallen en el R.E., no en el núcleo.

En levaduras, varios miembros de la familia de las PMTs forman complejos, homodímeros o heterodímeros (Girrbach and Strahl, 2003). Parece que es necesaria la presencia de ambas proteínas para conferir la máxima actividad manosiltransferasa *in vitro* (Manya *et al.*, 2004). Esto sugiere que deben funcionar como heterocomplejos, aunque no existe evidencia física de interacción entre *POMT1* y *POMT2*, ni se conoce el mecanismo que regula la formación de los mismos ni la función de estas pro-

teínas. Con los ensayos de doble híbrido dirigido nosotros no hemos conseguido detectar interacción entre POMT1 y POMT2, si bien, estos ensayos se realizaron, como ya se ha dicho, con fragmentos hidrofílicos de las proteínas ("loops" 1 y 5). Si POMT1 y POMT2 forman complejos, al menos los "loop"s de la zona del lumen de RE no participan en la formación de los mismos. Como en el caso del ensayo de unión al distroglicano, debe haber multitud de factores que determinen la formación de estos complejos.

Las proteínas detectadas en el rastreo de la genoteca de músculo esquelético (p38IP, CRYAB, HSJ2, Hsp40, COX-11 o ceramidasa mitocondrial) interactuaban con el "loop" 1 de POMT1, que por homología con el "loop" 1 de la ScPmt1, podría estar implicado en la actividad enzimática (Grrbach *et al.*, 2000). Mediante este estudio hemos determinado que sólo dos de ellas (p38IP y HSJ2) interactúan también con el "loop" 5 de POMT1. En levaduras se piensa que este "loop" participa en el reconocimiento del sustrato (Grrbach *et al.*, 2000). Es más, esas dos proteínas interactúan también con los "loops" 1 y 5 de POMT2, por lo que podrían ser dianas de manosiación. En el "loop" 5, hay tres dominios MIR que se encuentran tanto en manosiltransferasas como en receptores de rianodina y IP3, de ahí el nombre. Estos dominios parecen tener afinidad por ligando en I3PR. También se han encontrado en proteínas SDF2L (2MIR) y en SDF2L (3MIR), que forman parte de complejos proteicos de plegamiento en el R.E (Ponting, 2000; Meunier *et al.*, 2002).

POMT1 es una proteína integral de R.E. En este compartimento tienen lugar simultáneamente procesos de modificación post-traducciona (como la glicosilación), plegamiento de proteínas y agregación de subunidades que determinan la estructura secundaria o terciaria de las proteínas. Esto ocurre con la ayuda de ciertas chaperonas. En el lumen del R.E. hay gran cantidad de complejos proteicos de plegamiento, así como de proteínas que se están procesando. Aquí tiene lugar un fenómeno de control de calidad, dirigido por las chaperonas, por el

cual las proteínas incorrectamente plegadas o procesadas quedan retenidas en el R.E. para ser reparadas, y son redirigidas al citosol, donde se degradan por el proteosoma (Kleizen and Braakman, 2004).

La proteína de interacción con POMTs, HSJ2, es la chaperona homóloga a la DnaJ de *E. coli*, que pertenece a la familia de las chaperonas de choque térmico de Hsp40 (Hanai and Mashima, 2003). Se expresa principalmente en testículo, donde parece que se une a un proto-oncogen (*Pituitary tumor-transforming gene*, PTTG), cuyo RNA se expresa en células germinales masculinas (Pei, 1998). La familia de Hsp40 se caracteriza por poseer un dominio DNAJ I que determina la unión a Hsp70, proteína con la que actúa en el plegamiento de ciertas proteínas (Hennessy *et al.*, 2005). Curiosamente, Hsp40 también se une al "loop"1 de POMT1. Puede que HSJ2 esté ayudando en el procesamiento de las POMTs, o en la formación del heterocomplejo entre POMT1 y POMT2. Los dominios MIR en POMT1 y POMT2 podrían funcionar, por un lado como zonas de reconocimiento de sustrato y por otro, como posibles dominios de unión a chaperonas.

La proteína de interacción con p38 (p38IP) también interactúa con POMTs. Es un posible un factor de transcripción que está poco caracterizado (Gomes *et al.*, 2002). p38IP se conoce también como C13orf19, y su expresión se ha visto disminuida en varias líneas celulares de cáncer y en muestras de tejido de carcinoma de próstata. También puede aparecer alterada en distintos tipos de cáncer de riñón (Schmidt *et al.*, 2005). El análisis de secuencia de p38IP predice varios sitios de posible O-glicosilación. Existe un gran número de proteínas nucleares que se encuentran O-glicosiladas, entre ellas, multitud de factores de transcripción (Wells and Hart, 2003). Aunque el azúcar más común que se une en O-Ser/Thr suele ser NAcGlc, puede que existan sitios de O-manosiación en p38IP. Esto podría relacionar a POMT1 con señalización y regulación de la expresión génica, o bien con regulación del ciclo celular y cáncer.

La α cristalina B (CRYAB), aunque solo se ha visto interacción con el "loop" 1 de POMT1, tiene cierto interés por los tejidos donde actúa. Pertenece a la familia de chaperonas de choque térmico pequeñas. En corazón, es la Hsp pequeña más abundante y que mejor se conoce. Se piensa que estas chaperonas protegen a las proteínas del citoesqueleto en respuesta al estrés del entorno, responsable de un incorrecto ensamblaje de las proteínas. CRYAB actúa formando polímeros, los cuales se unen a los complejos inestables estabilizándolos y reparando el plegamiento incorrecto (Kumarapeli and Wang, 2004). Mutaciones en el gen CRYAB producen miopatía relacionada con desmina, ya que esta Hsp ayuda a ensamblar los filamentos de desmina en el citoesqueleto (McCart et al., 1998). En el cristalino, también se han descrito mutaciones en CRYAB que producen cataratas congénitas del polo posterior del cristalino. Se conocen muchas modificaciones post-traduccionales de esta proteína, las cuales son necesarias para formar un entramado proteico con CRYAA en el cristalino. Entre estas modificaciones se incluye la adición de O-NaC Glc (Berry et al., 2001). CRYAB podría presentar también algún O-monosilglicano que fuera igualmente importante para formar complejos en los tejidos donde actúa. Esta chaperona podría estar relacionada con POMT1 y con los defectos oculares que presentan los pacientes con WWS.

Por último, las otras dos proteínas que interactúan con POMTS: ceramidasa mitocondrial (con POMT1 Y POMT2) y COX11 (con POMT1) son proteínas mitocondriales. La ceramidasa mitocondrial podría estar implicada en la ruta del metabolismo de esfingolípidos dentro de la mitocondria (El Bawab et al., 2000). COX11 es una chaperona de unión a cobre necesaria para la formación del complejo citocromo C, en la cadena respiratoria de mitocondrias (Banci et al., 2004). Puede que estas proteínas necesiten estar manosi-ladas para ejercer su función en la mitocondria.

Si las proteínas que interactúan con POMT1 fuesen defectuosas, podrían afectar a la función de

POMT1. Por ejemplo, mutaciones en los genes de las chaperonas Hsp40, HSJ2, CRYAB o de otras chaperonas podrían afectar al procesamiento de POMT1, impidiendo que se plegara y/o se anclara a la membrana del R.E. correctamente. Igualmente serían incapaces de formar los posibles complejos entre POMT1 y POMT2, en caso de que actuaran ayudando en la formación de estos complejos. Del mismo modo, si estas chaperonas actúan sobre las dianas de monosilación de POMT1 (dístroglicano), podrían impedir el correcto procesamiento de las mismas. Podría ocurrir que estas u otras chaperonas controlen la maduración de las proteínas modificadas en el R.E. y requieran O-manosilglicanos. Si estuviesen mutadas en las zonas de O-manosilación, podrían provocar defectos en el control de calidad de ciertas proteínas, que se agregarían sin dirigirse a su destino y provocarían daños celulares.

Los genes de las proteínas que interactúan con POMT1, en general, podrían ser candidatos para la búsqueda de nuevas mutaciones relacionadas con los casos de WWS que aún no están asociados a ningún gen. La posible función que tengan estas proteínas con respecto a POMTs, ya sean dianas de manosilación o proteínas de plegamiento está por determinar.

El gen ortólogo de *POMT1* en el ratón tiene una estructura genómica muy parecida al gen humano. Ambos codifican una proteína de 724 aa. La secuencia proteica del ratón presenta un 93,8% de homología y un 85,7% de identidad con respecto a la secuencia humana, con lo que los datos de expresión y función de *Pomt1* en el ratón podrían extrapolarse a lo que ocurre en humanos. De hecho, la expresión detectada del gen *Pomt1* en el ratón adulto es muy similar a la del gen *POMT1* en humano. En ambos casos, la máxima expresión se detecta en testículo, y la mínima en músculo esquelético, aunque se expresa todos los tejidos analizados en cada caso. Este patrón de expresión se repite con el mensajero de *Pom2* en el ratón, lo que sugiere que ambas proteínas tienen mecanismos de regulación de la expresión muy parecidos.

En cuanto a la proteína, nuestros datos de *Western Blot* en tejidos adultos de ratón indican que Pomt1 se expresa en músculo esquelético y corazón. Por el contrario, parece que Pomt2 se expresa en testículo, pero no se detecta ni en músculo esquelético ni en corazón (Willer *et al.*, 2002). El que no hayamos detectado Pomt1 en testículo podría deberse a que en el ensayo de *Western Blot* hemos utilizado 40 µg de proteína (la mitad de la cantidad utilizada por Willer en la detección de Pomt2). Willer no detectó Pomt2 en corazón y músculo esquelético con el doble de extracto proteico que usamos nosotros, ni aún forzando las condiciones del ensayo (con extractos de 240 µg de proteína) (Willer, *comunicación personal*). Estos datos podrían sugerir funciones independientes de Pomt1 en músculo esquelético y corazón, y de Pomt2 en testículo. Se ha sugerido que POMT2 podría estar relacionado con la espermatogénesis, ya que su expresión en testículo se centra en el acrosoma de las espermátidas en fase de maduración y en los espermatozoides maduros (Willer *et al.*, 2002).

La inmunodetección de Pomt1 en músculo esquelético y corazón confirmó nuestros datos de *Western Blot* Pomt1 se expresa en todo el entramado del retículo sarcoplasmático de las células de músculo esquelético y cardíaco. En el músculo esquelético, Pomt1 se distingue también en la región subsarcolémica, justo por debajo de la membrana plasmática, donde ésta se comunica con el retículo a través de los túbulos T. En la célula del músculo cardíaco, la expresión de Pomt1 es más irregular, ya que el retículo sarcoplasmático está menos organizado. Adicionalmente, la expresión de Pomt2 en los mismos tejidos descarta la suposición de que ambas proteínas ejercen funciones distintas en diferentes tejidos. Pomt2 se localiza también en el retículo sarcoplasmático de células musculares y cardíacas. Estos datos sugieren que POMT1 y POMT2 ejercen su función en el tejido muscular, probablemente manosilando al α -dístroglicano, y refuerzan la hipótesis de que ambas proteínas actúan conjuntamente, aunque no demuestran que formen complejos.

El estudio de la expresión *in situ* del mensajero de *Pomt1*, así como la inmunolocalización de la proteína en el testículo de ratón confirmaron que, en este tejido, POMT1 y POMT2 ejercen su función, ya que tanto el RNA como la proteína de ambas se expresan de manera muy parecida.

En los túbulos seminíferos del testículo tiene lugar la espermatogénesis, un proceso por el cual las células germinales masculinas maduran hasta convertirse en espermatozoides (Gardner, 1966). La expresión de *Pomt1* se localizó en dos tipos concretos de células germinales masculinas, las espermatogonias y los espermatoцитos primarios. Las espermatogonias se consideran las células troncales del testículo. Su función principal es mantener la producción de células productoras de espermatozoides y regenerar nuevas células troncales. Estas células se dividen para dar lugar a espermatogonias de tipo A (célula troncal), o espermatogonias de tipo B (células diferenciadas). Estas últimas se transforman en espermatoцитos primarios, que entran en meiosis y quedan retenidos en profase durante mucho tiempo. Cuando se produce la primera división generan espermatoцитos secundarios, que llevan a cabo rápidamente la segunda división meiótica. Las espermátidas son las células haploides que resultan de esta división. Estas células llevan a cabo una breve pero intensa actividad transcripcional, en la cual muchos RNAs se almacenan en forma de ribonucleopartículas. Después sufren una serie de cambios morfológicos en el citoplasma y el núcleo para transformarse en espermatozoides. Este proceso, denominado espermiogénesis, es independiente de transcripción, y los RNAs almacenados tras la meiosis se van traduciendo a medida que se van necesitando (Hecht, 1998; Schmidt *et al.*, 1999).

La expresión de *Pomt1* detectada en la primera fase de la espermatogénesis sugiere que los RNAs de *Pomt1* se transcriben durante la fase diploide, y que la proteína es necesaria en procesos posteriores. *Pomt1* debe traducirse en los espermatoцитos secundarios o en las espermátidas tempranas. En las espermátidas redondas no se detectaron niveles

significativos de mensajero, lo que indica que el RNA de *Pomt1* no se almacena en forma de ribonucleopartículas para traducirse más tarde.

En la fase de espermátidas redondas, varios orgánulos (núcleo, R.E., aparato de Golgi, mitocondrias, centriolo, etc) llevan a cabo cambios bioquímicos y estructurales. En el núcleo, las histonas se sustituyen por protaminas, las mitocondrias y el centriolo migran para formar el axonema y se forma el acrosoma a partir del R.E. y del aparato de Golgi principalmente. En la fase de elongación (fase tardía), la cromatina condensa, el acrosoma se compacta y se desprende el cuerpo residual con los orgánulos que quedan en el citoplasma (Dadoune, 1994; Schmidt *et al.*, 1999).

Pomt1 podría tener un papel importante durante la espermiogénesis. La expresión de la proteína en el acrosoma de las espermátidas en todas sus fases de maduración confirmó lo que habíamos supuesto: el RNA de *Pomt1* se traduce antes de la generación de las espermátidas (fase haploide), porque la proteína ya está presente en espermátidas redondas, en fase de elongación y en fase de maduración.

El acrosoma se forma en las espermátidas de fase temprana (fase Golgi), principalmente a partir de las vesículas del Golgi que comienzan a fusionarse para formar en la parte anterior del núcleo la vesícula acrosomal. En la fase de cubierta, el acrosoma se alarga aplastándose sobre el núcleo. A éste se incorporan gránulos con multitud de enzimas líticas y glicoproteínas. En la fase tardía, el acrosoma se vuelve más compacto cubriendo al núcleo en un hemisferio (fase acrosomal), para terminar cubriendo prácticamente el núcleo en su forma más compacta en las espermátidas maduras (Clermont and Tang, 1985; Abou-Haila and Tulsiani, 2000)

Aunque el acrosoma proviene principalmente de vesículas del aparato de Golgi, se han descrito casos de proteínas de R.E. que se translocan al Golgi para formar parte del acrosoma. Un ejemplo de éstas es la calreticulina. También existen proteínas que se incorporan al acrosoma directamente desde el R.E. a través de una vía llamada "extra-Golgi" (Ta-

nii *et al.*, 1992; Nakamura *et al.*, 1993). *Pomt1* podría llegar hasta el acrosoma a través de cualquiera de estas dos vías.

En la superficie de los espermatozoides maduros se expresan multitud de moléculas de reconocimiento de carbohidratos (glicosiltransferasas, glicosidasas y/o moléculas tipo lectina), que reconocen las cadenas de oligosacáridos (sobre todo O-glicanos) de las glicoproteínas de la zona pelúcida (ZP) en los oocitos. Las proteínas de la superficie del espermatozoide están cubiertas por una capa de carbohidratos que protegen los sitios de reconocimiento. Durante la capacitación, estas moléculas se liberan y las proteínas se unen a sus ligandos en la ZP para desencadenar la reacción acrosómica (Tulsiani, 2000).

El mecanismo por el cual una glicosiltransferasa en la superficie del espermatozoide reconoce los O-glicanos de la glicoproteína ZP3 está muy estudiado. La β 1-4Galactosiltransferasa (GalT) funciona como una lectina reconociendo los residuos de NAcGlc de ZP3. En el espermatozoide decapitado, GalT se encuentra unida a poli-N-acetil lactosaminas (NAcGlc-Gal)_n por los residuos de NAcGlc. Cuando ocurre el fenómeno de capacitación, se liberan estos polímeros dejando expuesta a GalT, que reconoce los NAcGlc de ZP3. Después de la unión, ocurre la reacción acrosómica por la que se liberan enzimas líticas que permiten la entrada del núcleo en el óvulo. El óvulo libera al medio N-Acetil glucosaminidasa para que se rompa la unión de GalT a NAcGlc de ZP3 y evitar así la polispermia (Shur and Hall, 1982; Nixon *et al.*, 2001).

POMT1 podría actuar de manera similar a GalT reconociendo residuos de O-manosa unidos a las proteínas de la ZP, aunque de momento no se han descrito O-manosilglicanos entre los oligosacáridos de estas glicoproteínas. Entre las cadenas de O-glicanos de las ZP, hay muchas terminadas en Gal β 1-4NAcGlc, que parecen estar implicadas en el reconocimiento y unión entre los gametos (Easton *et al.*, 2000; Dell *et al.*, 2003). Los O-manosilglicanos del α -dístroglicano, en cuya síntesis participan

POMT1 y POMT2, son del tipo Sia α 2-3Gal β 1-4NAcGlc1-2Man-Ser/Thr. Nuestros datos mostraron que el distroglicano no se expresa en ningún tipo de célula germinal, sino que queda relegado a la pared de músculo liso de los túbulos seminíferos. Por este motivo quedaría descartada como diana de manosiación de POMT1 en el testículo, al menos durante la espermatogénesis. Esto sugiere la existencia de nuevas dianas de manosiación en el testículo. El complejo POMT1/POMT2 podría comenzar la síntesis de O-manosilglicanos del tipo que presenta el α -distroglicano o más cortos (sólo de O-Man) en glicoproteínas de superficie del espermatozoide, que podrían participar en el reconocimiento de los disacáridos Gal β 1-4NAcGlc de las proteínas de la ZP. Futuros estudios nos ayudarán a entender cuál es el papel concreto que juegan POMT1 y POMT2 en la espermiogénesis y, si están relacionados o no con fertilidad.

En humanos, POMT1 está relacionado con enfermedades neuromusculares como el síndrome de Walker-Warburg. WWS es la más grave de las “distroglicanopatías” que se conocen, ya que los individuos que lo padecen mueren durante los primeros meses de vida y no sobreviven más de 3 años. Es una enfermedad de herencia autosómica recesiva. Las características clínicas incluyen distrofia muscular congénita, hidrocefalia, defectos en la migración neuronal que causan lisencefalia de tipo II, agenesia del cuerpo calloso, fusión de los hemisferios, dilatación del cuarto ventrículo, hipoplasia cerebelar y encefalocele. Además del fenotipo cerebral, los pacientes presentan anomalías oculares congénitas como cataratas, microftalmia, buftalmia, hiperplasia primaria del cuerpo vítreo y anomalía de Meter (van Reeuwijk *et al.*, 2005a). El papel de POMT1 durante el desarrollo muscular y cerebral parece ser esencial.

En el ratón, *Pomt1* se expresa a lo largo de todo el desarrollo embrionario, sobre todo en las zonas donde se están formando el músculo, el corazón, el ojo y el cerebro. En el cerebro, la máxima expresión de *Pomt1* se concentra en el techo del cuarto ventrículo, fuente de líquido cefalorraquídeo (LCR). El LCR

se forma a partir de los plexos coroideos en las cavidades ventriculares del cerebro (ventrículos laterales, tercer y cuarto ventrículo). Fluye por el sistema ventricular, conectado con el canal central de la médula espinal. Los plexos coroideos son invaginaciones de células endoteliales que están cubiertas por una capa externa de pía muy vascularizada. En el cuarto ventrículo, existen unos poros por los que sale el LCR hacia la médula espinal, conocidos como Foramina de Luschka (en los laterales) o de Magendie (en la zona medial) (Kaufman and Bard, 1999). Cuando estos poros se encuentran obstruidos, las cavidades ventriculares se llenan de LCR y se produce hidrocefalia, que es una de las características clínicas de los pacientes de WWS. Otra característica que presentan los pacientes con WWS es la fusión de los hemisferios cerebrales (Beltran-Valeiro de Bernabe *et al.*, 2002). Es necesario que se forme una capa de meninge continua, junto con una membrana basal asociada a ella, para que se forme la fisura interhemisférica en el cortex cerebral. La expresión en el techo del cuarto ventrículo podría estar relacionada también con la formación de esas membranas basales asociadas a la capa de pía.

El techo de los ventrículos laterales comienza a estratificarse cuando las neuronas post-mitóticas de la capa del manto migran hacia la capa marginal (más externa). Éstas forman el cortex neopial, que dará lugar al futuro cortex cerebral de los hemisferios cerebrales (Kaufman and Bard, 1999). Cuando la migración de estas células es defectuosa se desorganizan las capas del cortex cerebral, dando lugar a una serie de anomalías estructurales, entre ellas lisencefalia. Los pacientes con WWS presentan, además de lisencefalia, un agrandamiento de los ventrículos laterales. La expresión de *Pomt1* en las células de la capa del manto de los ventrículos laterales indica que *Pomt1* podría estar implicado en la migración neuronal.

En cuanto a la expresión en el ojo en desarrollo, hemos visto que *Pomt1* se expresa en la capa neural (interna) y la capa pigmentada (externa) de la retina, aunque su expresión es mayor en la red vascu-

lar de la cavidad haloidea. Esta red contacta con el cristalino y la capa neural de retina, y es responsable de formar el humor vítreo. Curiosamente, el α -dístroglicano se ha detectado en la lámina basal de la capa neural y en el parénquima de la retina, donde parece que se encarga de la organización de las sinapsis retinianas (Moukhles *et al.*, 2000). Estos datos relacionan los defectos oculares encontrados en los pacientes WWS más directamente con *POMT1* y la deficiencia de glicosilación del α -dístroglicano.

En resumen, *Pomt1* se expresa en zonas que parecen críticas para el correcto desarrollo del cerebro y el ojo, que cuando se ven afectadas podrían dar lugar a malformaciones del tipo que presentan los pacientes con WWS. Parece que *Pomt1* es más importante para el desarrollo del sistema nervioso que para el muscular, aunque se expresa muy claramente en el corazón en el desarrollo. La distrofia muscular congénita en estos pacientes podría considerarse una característica clínica secundaria en comparación con las malformaciones cerebrales y oculares que presentan estos pacientes.

Como hemos visto, en el adulto, *Pomt1* parece ejercer su función en músculo y corazón, probablemente O-manosilando al dístroglicano, aunque no sabemos aún cual es su papel en el cerebro. Recientemente se ha descrito el patrón de expresión de los genes *POMGnT1*, *fukutina* y *POMT1* en cerebro de ratón. Parece ser que los tres genes se expresan principalmente en astrocitos, que están implicados en la formación de membranas basales en los límites de la glía. *POMT1* y *POMGnT1* se expresan también en muchas neuronas maduras, lo que indica que *POMT1* y *POMGnT1* tienen algún papel adicional en el cerebro adulto (Yamamoto *et al.*, 2004).

Junto con los estudios de expresión de *Pomt1*, hemos generado el animal *knockout* mediante interrupción alélica en células ES. En un principio pensamos que podríamos obtener un animal modelo de estudio de enfermedades neuromusculares, pero la interrupción de *Pomt1* resultó ser letal durante la

embriogénesis. Los individuos heterocigotos resultaron ser viables y fértiles, y no mostraron ningún fenotipo anormal aparente, lo que concuerda con la herencia recesiva de los pacientes WWS. La letalidad embrionaria temprana (E6.5-E7.5) observada en los ratones *Pomt1*^{-/-}, contrasta con los efectos de las mutaciones encontradas en los pacientes afectados con WWS. La razón por la que la mutación *Pomt1*^{-/-} representa un fenotipo evidentemente más drástico se debe a los defectos que hemos observado en la membrana de Reichert. Esta membrana es específica de roedores. Es una de las primeras membranas que se forman en el embrión y funciona como filtro, proporcionando nutrientes al embrión e impidiendo el paso de células maternas a éste (Salamat *et al.*, 1995; Williamson *et al.*, 1997). En el ratón, el dístroglicano juega un papel importante a la hora de ensamblar los componentes de las membranas basales, uniéndose a la laminina soluble y organizándola en la superficie celular. (Henry and Campbell, 1998). Es probable que la glicosilación del α -dístroglicano sea un requisito indispensable para la formación de otras membranas basales en humanos. El hecho de que los pacientes de WWS presenten defectos en las membranas basales de los límites de la glía, avala esta hipótesis (Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2002).

Está bastante aceptado que las cadenas carbonadas en general, y en particular los O-manosilglicanos son necesarias a la hora de determinar las propiedades de unión a ligando del α -dístroglicano (Martin, 2003). De hecho, se ha visto que el dístroglicano está hipoglicosilado y su unión a laminina se ve afectada en tejido muscular de pacientes con WWS, MEB, FCMD y CMD1C (Brockington *et al.*, 2001a; Michele *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004; Muntoni *et al.*, 2004; Muntoni and Voit, 2004). *In vitro*, la correcta glicosilación del dístroglicano parece ser crucial para que el procesamiento de esta proteína tenga lugar, y para que se dirija a la superficie celular (Esapa *et al.*, 2003). *In vivo*, se han visto defectos en la dirección de las subunidades α y β del dístroglicano a su destino debido a la hipoglicosila-

ción observada en tejido muscular y cerebral del ratón miodistrófico, *myd* (Michele *et al.*, 2002). Este ratón es un modelo natural causado por una mutación espontánea que anula el gen *Large*, posible glicosiltransferasa. Presenta un fenotipo con distrofia muscular severa principalmente, aunque también presenta defectos en la migración neuronal, anomalías cardíacas y defectos en la transmisión retinal (Grewal and Hewitt, 2002; Holzfeind *et al.*, 2002).

Curiosamente, hemos observado una reducción de ambas subunidades α y β del distroglicano en la membrana de Reichert de los embriones *Pomt1*^{-/-}, que obviamente, se debe a un reclutamiento deficiente de laminina en esta membrana. En el ratón *knockout* del distroglicano, la falta de reclutamiento de laminina conduce a una pérdida de la integridad de la membrana de Reichert y causa letalidad embrionaria en la gastrulación temprana (Williamson *et al.*, 1997). De hecho, el fenotipo observado en los embriones carentes de *Pomt1* mimetizan el modelo *knockout* para el distroglicano. Es más, la letalidad embrionaria observada en nuestro modelo se debe a un fallo en la función de la membrana de Reichert, que deja de actuar como filtro entre el embrión y el tejido materno.

Debido a que la membrana de Reichert es exclusiva de roedores, y a que los residuos glicosídicos del distroglicano están implicados directamente en el ensamblaje de esta membrana, sería difícil establecer modelos de ratón apropiados para las CMDs relacionadas con la glicosilación del distroglicano (distroglicanopatías). Una de las posibles soluciones para solventar este problema sería la eliminación de genes en tejidos específicos, como se ha hecho recientemente con el distroglicano en músculo y en cerebro. La eliminación selectiva del distroglicano en el cerebro de ratón (en los astrocitos) recuerda las anomalías encontradas en el cerebro de pacientes con CMDs asociadas a la hipoglicosilación del α -distroglicano. Parece que el distroglicano es necesario para formar las membranas basales que acompañan a las capas de las meninges, concretamente a la pía en el cortex cerebral y cerebelar (Mo-

ore *et al.*, 2002). La eliminación del distroglicano en el músculo esquelético desarrollado da lugar a un fenotipo leve de distrofia muscular, ya que las células satélite del músculo, que siguen expresando distroglicano, aportan una eficiente y continua regeneración del músculo esquelético. Esto ocurre en músculo esquelético de pacientes con distrofia muscular suave debida al incorrecto procesamiento del distroglicano (Cohn *et al.*, 2002).

Existen otros modelos en el ratón que también presentan letalidad embrionaria debido a defectos en la formación de esta membrana. Recientemente se ha descrito el caso de la *fukutina*, una posible glicosiltransferasa relacionada con la glicosilación del distroglicano (Kurahashi *et al.*, 2005). En humanos, la inserción de un retrotransposón de 3kb en la región 3' no traducida del gen de la *fukutina* causa la CMD de Fukuyama (FCMD) (Kobayashi *et al.*, 1998), si bien mutaciones en homocigosis en la región codificante producen efectos más graves similares a los de WWS (Hayashi *et al.*, 2001; Beltran-Valero de Bernabe *et al.*, 2003). Para solventar el problema de letalidad embrionaria se han generado ratones quimera para el gen de la *fukutina*, que desarrollan distrofia muscular severa con disminución de la glicosilación del α -distroglicano y su unión a laminina, desorganización de las capas del cortex cerebral, fusión de los hemisferios en algunos puntos y anomalías en la lente, con la pérdida de la estructura laminar y desprendimiento de retina (Takeda *et al.*, 2003). Estos datos fenotípicos se parecen a los encontrados en pacientes con FCMD. Recientemente, un estudio más exhaustivo del desarrollo cerebral en estos ratones quimera indica que los defectos en la corteza cerebral no se deben a un fallo en la migración de las neuronas, sino a la desorganización de la membrana basal de los límites de la glía, la cual está causada por la pérdida de unión entre el distroglicano hipoglicosilado y sus ligandos en la membrana basal (Chiyonobu *et al.*, 2005).

El ratón miodistrófico *myd* muestra un fenotipo de distrofia muscular con algún tipo de anomalía ce-

rebral y ocular. La mutación en el gen *Large* que presenta este ratón es una delección que ocurre de forma natural (Grewal and Hewitt, 2002; Holzfeind *et al.*, 2002). En humanos, mutaciones en el gen *LARGE* provocan un tipo de CMD con deficiencia secundaria de merosina (MDC1C) (Longman *et al.*, 2003). *LARGE*, es una posible glicosiltransferasa implicada en la glicosilación del α -dístroglicano, ya que tanto en el ratón *myd* como en la CMD equivalente en humanos (MDC1D), el dístroglicano se encuentra hipoglicosilado. En MDC1D, únicamente se ha descrito un caso con mutaciones en el gen *LARGE* que presenta anomalías cerebrales y oculares (Longman *et al.*, 2003). El motivo por el que el ratón *myd* no muestra un fenotipo letal nos hace suponer que los O-manosilglicanos implicados en la formación de membranas basales tempranas, como la membrana de Reichert en cuya síntesis participa *Pomt1*, no están alterados en el ratón *myd*. Esto supone que *Large* no participa en la síntesis de las mismas cadenas en que participa *Pomt1*.

Supuestamente, la unión del α -dístroglicano a uno de sus ligandos (laminina $\alpha 2$), está mediada por O-manosilglicanos (Sasaki *et al.*, 1998; Endo and Toda, 2003). Aproximadamente el 70% de los O-glicanos en el dístroglicano, son del tipo O-manosilglicanos, y el 30% restante son O-glicanos de tipo mucina, iniciados con residuos de NAcGal (Sasaki *et al.*, 1998). El 30% de O-glicanos tipo mucina podría unirse también a laminina, ya que al tratar los O-glicanos del dístroglicano con neuraminidasa (que elimina los ácidos siálicos) no se inhibe por completo la unión a laminina (Ervasti and Campbell, 1993). Nuestros datos en el embrión, junto con los datos de estudios en músculo de pacientes WWS (Kim *et al.*, 2004), indicarían que, en tejido no muscular, los O-manosilglicanos son esenciales para la maduración y/o la dirección del dístroglicano a la superficie celular, mientras que en músculo afectan principalmente a su unión con laminina. Ni los residuos restantes de O-glicanos, ni otros receptores de laminina como las $\beta 1$ integrinas, compensan la pérdida de unión mediada por los O-manosilglicanos.

POMT1 y *POMGnT1* participan en las primeras etapas de la formación del tetrasacárido del tipo Sia $\alpha 2$ -3Gal $\beta 1$ -4NAcGlc1-2Man-Ser/Thr en el α -dístroglicano. Son glicosiltransferasas propiamente dichas, puesto que de ambas se ha demostrado la actividad enzimática (Yoshida *et al.*, 2001; Many *et al.*, 2004). Estos dos genes son los responsables de WWS y MEB, respectivamente, las dos dístroglicopatías más graves. Los genes que introducen residuos de galactosa y siálico en estas cadenas aún no se han identificado.

El gen *LARGE* codifica una putativa glicosiltransferasa bifuncional. Presenta dos dominios Asp-X-Asp que están muy conservados en familias de glicosiltransferasas y son esenciales para la actividad enzimática (Breton and Imberty, 1999). El dominio más proximal tiene homología con una familia de glicosiltransferasas implicadas en la síntesis de lipopolisacáridos, y el más distal tiene homología con la familia de glicosiltransferasas que añaden residuos del disacárido Gal $\beta 1$ -3NAcGlc (Grewal *et al.*, 2005). Recientemente se ha demostrado que la sobreexpresión de *LARGE* en células musculares de pacientes con WWS hace que aumente la hiperglicosilación del α -dístroglicano y que se restablezca la unión a laminina. Dado que la pérdida de unión a ligando parece contribuir significativamente a las patologías de estas enfermedades, estos hallazgos resultan muy interesantes, puesto que el incremento de la actividad de *LARGE*, podría representar una diana terapéutica en las distrofias musculares (Barrisi *et al.*, 2004). Otros autores han demostrado que *LARGE* no transfiere galactosa ni ácido siálico al α -dístroglicano, y que es capaz de reestablecer la funcionalidad del α -dístroglicano en células que no sintetizan O-manosilglicanos modificando cadenas de O-glicanos tipo mucina y de N-glicanos en el dístroglicano (Patnaik and Stanley, 2005). Estos datos corroboran que la principal función de *LARGE* reside en el músculo esquelético, donde únicamente se encarga de mantener la unión con laminina, y que no participa en la formación de O-manosilglicanos, por lo que, el fenotipo que causa es principal-

mente de distrofia muscular (MDC1D), y puede que con alguna alteración neuronal no debería ser nunca tan grave como las que presentan WWS o MEB.

Parece que fukutina y FKRП participan en la glicosilación del α -dístroglicano, puesto que el α -dístroglicano en músculo de pacientes FCMD y MDC1C presenta hipoglicosilación. Lo que no está claro es si participan en la síntesis de O-manosilglicanos o de O-glicanos de otro tipo (tipo mucina). Estos genes codifican posibles glicosiltransferasas, aunque su actividad enzimática no ha sido demostrada aún (Muntoni and Voit, 2004). Fukutina y FKRП presentan en su extremo C-terminal un motivo de Asp-X-Asp típico de glicosiltransferasas. Además, parece que el análisis de predicción de secuencia de FKRП muestra homología con una transferasa de ligando fosforilado (Brockington *et al.*, 2001a). Podría ser que alguna de estas proteínas participase en la síntesis de los O-manosilglicanos ya sea como glicosiltransferasas, o como proteínas que ayuden en la función de POMT1 y POMGNT1 en la presentación del ligando fosforilado a las mismas (p.e. doliquilfosfato-manosa, Dol-P- β -man, o UDP-NAcGlc).

Tal como se ha hecho con el gen de la *fukutina* (Takeda *et al.*, 2003), nosotros hemos generado ratones químera para el gen *Pomt1*. Los datos preliminares muestran que los ratones con un grado medio de quimerismo se comportan como los ratones *wt*, y no muestran anomalías fenotípicas aparentes, lo que concuerda con el fenotipo observado en los ratones heterocigotos *Pomt1*^{+/-}. Los ratones obteni-

dos hasta el momento no presentan un grado suficiente de quimerismo que permita estudiar fenotipos que se puedan relacionar con las CMDs con afectación neuronal. Es necesario obtener ratones con mayor contribución de células ES^{*Pomt1*^{-/-}} para poder estudiar si en el ratón encontramos defectos parecidos a los que se observan en pacientes con WWS.

Adicionalmente, estamos generando el ratón condicional. En breve conseguiremos el ratón *Pomt1*^{loxP/loxP}. Este ratón permitirá eliminar *Pomt1* en tejidos, tipos celulares específicos e incluso tiempos de desarrollo para estudiar las consecuencias de la falta de *Pomt1* en los mismos. Cuando crucemos ratones *Pomt1*^{loxP/loxP} con ratones transgénicos que expresen CRE bajo el control de promotores específicos de músculo esquelético, corazón, cerebro, testículo, o de tiempos de desarrollo determinados, podremos establecer los efectos concretos que tiene la eliminación de *Pomt1* en relación con la hipoglicosilación del α -dístroglicano (como se supone, en músculo y cerebro). Además, sería interesante conocer la posible función de *Pomt1* en testículo, y si está implicada en fertilidad o no. Del mismo modo, podríamos saber si está relacionado en este tejido con la O-manosilación de alguna glicoproteína que participe en el reconocimiento entre espermatozoide y óvulo.

Futuros estudios se encaminarán a conocer en más detalle la implicación de los O-manosilglicanos en enfermedades neuromusculares y la posible función de los O-manosilglicanos en fertilidad.

CONCLUSIONES

1. POMT1 interacciona con varias proteínas detectadas mediante el sistema de doble híbrido en levadura: p38IP, CRYAB, COX11, HSJ2, Hsp40 y Ceramidasa mitocondrial. p38IP y HSJ2 también interaccionan con POMT2, por lo que podrían ser dianas de manosiación. Mutaciones en estos genes podrían causar WWS en alguno de los casos en los que aún no se ha identificado el gen responsable.
2. A lo largo del desarrollo embrionario del ratón, el mensajero de *Pomt1* se expresa en aquellos tejidos que se ven más afectados en los pacientes con WWS: el músculo, el ojo y sobre todo el cerebro en desarrollo.
3. En el ratón adulto, la proteína Pomt1 se localiza en el retículo sarcoplásmico de células de músculo esquelético y cardíaco, mientras que en testículo, Pomt1 se localiza en el acrosoma de las espermátidas en todas sus fases de maduración a espermatozoide.
4. La proteína Pomt2 se localiza en los mismos tejidos que Pomt1 en el ratón adulto, con lo que se refuerza la hipótesis de que ambas Pomts actúan juntas a la hora de ejercer su función. En tejido muscular probablemente estén manosiando a α -dístroglicano, principal diana de O-manosiación de Pomts. Sin embargo, las células germinales de testículo no expresan α -dístroglicano, por lo que en este tejido, o bien existe otra diana de manosiación distinta, o las Pomts ejercerían otra función, pudiendo estar implicadas en fertilización.
5. La eliminación dirigida de *Pomt1* en el ratón ha resultado ser letal durante el desarrollo embrionario. La letalidad se debe a defectos en la formación de la membrana de Reichert causados por un déficit de glicosilación del α -dístroglicano. Los ratones heterocigotos *Pomt1*^{+/-} son viables y fértiles. POMT1 podría estar implicada en la formación de otras membranas basales esenciales para el desarrollo también en humanos.
6. Los ratones quimera generados a partir de células ES^{*Pomt1*^{-/-}} con un grado medio de quimerismo se comportan como individuos *wt* y no presentan fenotipos anormales aparentes. Es necesario obtener ratones con un mayor grado de quimerismo. Estos ratones permitirán estudiar cómo afecta la ausencia de *Pomt1* en cada tejido dependiendo del grado de contribución de células ES mutadas al mismo.
7. Estamos generando el ratón *knockout* condicional para *Pomt1*. El animal *Pomt1*^{loxP/loxP} permitirá obtener modelos de estudio carentes de *Pomt1* en tejidos específicos o en un tiempo de desarrollo concreto al cruzarlos con ratones transgénicos que expresen CRE bajo el control de un promotor inducible o específico de tejido.

BIBLIOGRAFÍA

- Abou-Haila A, Tulsiani DR (2000) Mammalian sperm acrosome: formation, contents, and function. *Arch Biochem Biophys* 379:173-182..
- Banci L, Bertini I, Cantini F, Ciofi-Baffoni S, Gonnelli L, Mangani S (2004) Solution structure of Cox11, a novel type of beta-immunoglobulin-like fold involved in CuB site formation of cytochrome c oxidase. *J Biol Chem* 279:34833-34839..
- Barresi R, Michele DE, Kanagawa M, Harper HA, Dovico SA, Satz JS, Moore SA, Zhang W, Schachter H, Dumanski JP, Cohn RD, Nishino I, Campbell KP (2004) LARGE can functionally bypass alpha-dystroglycan glycosylation defects in distinct congenital muscular dystrophies. *Nat Med* 10:696-703..
- Bartel PL, Fields S (1995) Analyzing protein-protein interactions using two-hybrid system. *Methods Enzymol* 254:241-263.
- Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. *Am J Hum Genet* 71:1033-1043.
- Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M, Muntoni F (2004) Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* 41:e61.
- Beltran-Valero de Bernabe DB, van Bokhoven H, van Beusekom E, Van den Akker W, Kant S, Dobyns WB, Cormand B, Currier S, Hamel B, Talim B, Topaloglu H, Brunner HG (2003) A homozygous nonsense mutation in the fukutin gene causes a Walker-Warburg syndrome phenotype. *J Med Genet* 40:845-848.
- Berry V, Francis P, Reddy MA, Collyer D, Vithana E, MacKay I, Dawson G, Carey AH, Moore A, Bhattacharya SS, Quinlan RA (2001) Alpha-B crystallin gene (CRYAB) mutation causes dominant congenital posterior polar cataract in humans. *Am J Hum Genet* 69:1141-1145.
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Bradley A, Evans M, Kaufman MH, Robertson E (1984) Formation of germ-line chimaeras from embryo-derived teratocarcinoma cell lines. *Nature* 309:255-256.
- Breton C, Imberty A (1999) Structure/function studies of glycosyltransferases. *Curr Opin Struct Biol* 9:563-571.
- Brockington M, Blake DJ, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Ponting CP, Estournet B, Romero NB, Mercuri E, Voit T, Sewry CA, Guicheney P, Muntoni F (2001a) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) cause a form of congenital muscular dystrophy with secondary laminin alpha2 deficiency and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Am J Hum Genet* 69:1198-1209.
- Brockington M, Yuva Y, Prandini P, Brown SC, Torelli S, Benson MA, Herrmann R, Anderson LV, Bashir R, Burgunder JM, Fallet S, Romero N, Fardeau M, Straub V, Storey G, Pollitt C, Richard I, Sewry CA, Bushby K, Voit T, Blake DJ, Muntoni F (2001b) Mutations in the fukutin-related protein gene (FKRP) identify limb girdle muscular dystrophy 2I as a milder allelic variant of congenital muscular dystrophy MDC1C. *Hum Mol Genet* 10:2851-2859.
- Cacan R, Duvet S, Kmiecik D, Labiau O, Mir AM, Verbert A (1998) 'Glyco-deglyco' processes during the synthesis of N-glycoproteins. *Biochimie* 80:59-68.
- Capecchi MR (1989a) Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244:1288-1292.
- Capecchi MR (1989b) The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet* 5:70-76.
- Chiba A, Matsumura K, Yamada H, Inazu T, Shimizu T, Kusunoki S, Kanazawa I, Kobata A, Endo T (1997) Structures of sialylated O-linked oligosaccharides of bovine peripheral nerve alpha-dystroglycan. The role of a novel O-mannosyl-type oligosaccharide in the binding of alpha-dystroglycan with laminin. *J Biol Chem* 272:2156-2162.
- Chien CT, Bartel PL, Sternglanz R, Fields S (1991) The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc Natl Acad*

- Sci U S A 88:9578-9582.
- Chiyonobu T, Sasaki J, Nagai Y, Takeda S, Funakoshi H, Nakamura T, Sugimoto T, Toda T (2005) Effects of fukutin deficiency in the developing mouse brain. *Neuromuscul Disord* 15:416-426.
- Clermont Y, Tang XM (1985) Glycoprotein synthesis in the Golgi apparatus of spermatids during spermiogenesis of the rat. *Anat Rec* 213:33-43.
- Cohn RD (2005) Dystroglycan: important player in skeletal muscle and beyond. *Neuromuscul Disord* 15:207-217.
- Cohn RD, Campbell KP (2000) Molecular basis of muscular dystrophies. *Muscle Nerve* 23:1456-1471.
- Cohn RD, Henry MD, Michele DE, Barresi R, Saito F, Moore SA, Flanagan JD, Skwarchuk MW, Robbins ME, Mendell JR, Williamson RA, Campbell KP (2002) Disruption of DAG1 in differentiated skeletal muscle reveals a role for dystroglycan in muscle regeneration. *Cell* 110:639-648.
- Cormand B, Pihko H, Bayes M, Valanne L, Santavuori P, Talim B, Gershoni-Baruch R, Ahmad A, van Bokhoven H, Brunner HG, Voit T, Topaloglu H, Dobyns WB, Lehesjoki AE (2001) Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology* 56:1059-1069.
- Dadoune JP (1994) The cellular biology of mammalian spermatids: a review. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 78:33-40.
- Dell A, Chalabi S, Easton RL, Haslam SM, Sutton-Smith M, Patankar MS, Lattanzio F, Panico M, Morris HR, Clark GF (2003) Murine and human zona pellucida 3 derived from mouse eggs express identical O-glycans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:15631-15636.
- Diesen C, Saarinen A, Pihko H, Rosenlew C, Cormand B, Dobyns WB, Dieguez J, Valanne L, Joensuu T, Lehesjoki AE (2004) POMGnT1 mutation and phenotypic spectrum in muscle-eye-brain disease. *J Med Genet* 41:e115.
- Durbeej M, Campbell KP (2002) Muscular dystrophies involving the dystrophin-glycoprotein complex: an overview of current mouse models. *Curr Opin Genet Dev* 12:349-361.
- Durbeej M, Henry MD, Ferletta M, Campbell KP, Ekblom P (1998) Distribution of dystroglycan in normal adult mouse tissues. *J Histochem Cytochem* 46:449-457.
- Easton RL, Patankar MS, Lattanzio FA, Leaven TH, Morris HR, Clark GF, Dell A (2000) Structural analysis of murine zona pellucida glycans. Evidence for the expression of core 2-type O-glycans and the Sd(a) antigen. *J Biol Chem* 275:7731-7742.
- El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA (2000) Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* 275:21508-21513.
- Endo T (1999) O-mannosyl glycans in mammals. *Biochim Biophys Acta* 1473:237-246.
- Endo T (2004) Structure, function and pathology of O-mannosyl glycans. *Glycoconj J* 21:3-7.
- Endo T, Toda T (2003) Glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Biol Pharm Bull* 26:1641-1647.
- Ervasti JM, Campbell KP (1991) Membrane organization of the dystrophin-glycoprotein complex. *Cell* 66:1121-1131.
- Ervasti JM, Campbell KP (1993) A role for the dystrophin-glycoprotein complex as a transmembrane linker between laminin and actin. *J Cell Biol* 122:809-823.
- Esapa CT, Bentham GR, Schroder JE, Kroger S, Blake DJ (2003) The effects of post-translational processing on dystroglycan synthesis and trafficking. *FEBS Lett* 555:209-216.
- Fields S, Song O (1989) A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340:245-246.
- Finne J, Krusius T, Margolis RK, Margolis RU (1979) Novel mannitol-containing oligosaccharides obtained by mild alkaline borohydride treatment of a chondroitin sulfate proteoglycan from brain. *J Biol Chem* 254:10295-10300.
- Fukuda S, Sumii M, Masuda Y, Takahashi M, Koike N, Teishima J, Yasumoto H, Itamoto T, Asahara T, Dohi K, Kamiya K (2001) Murine and human SDF2L1 is an endoplasmic reticulum stress-inducible gene and encodes a new member of the Pmt/rt protein family. *Biochem Biophys Res Commun* 280:407-414.
- Gardner PJ (1966) Fine structure of the seminiferous tubule of the Swiss mouse. The spermatid. *Anat Rec* 155:235-249.
- Gardner RL (1968) Mouse chimeras obtained by the injection of cells into the blastocyst. *Nature* 220:596-597.
- Gentzsch M, Tanner W (1997) Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* 7:481-486.
- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* 350:87-96.
- Girrbach V, Strahl S (2003) Members of the evolutionarily conserved PMT family of protein O-mannosyltransferases form distinct protein complexes among themselves. *J Biol Chem* 278:12554-12562.
- Girrbach V, Zeller T, Priesmeier M, Strahl-Bolsinger S (2000) Structure-function analysis of the dolichyl phosphate-mannose: protein O-mannosyltransferase ScPmt1p. *J Biol Chem* 275:19288-19296.
- Gomes I, Sharma TT, Edassery S, Fulton N, Mar BG, Westbrook CA (2002) Novel transcription factors in human CD34

- antigen-positive hematopoietic cells. *Blood* 100:107-119.
- Grewal PK, Hewitt JE (2002) Mutation of Large, which encodes a putative glycosyltransferase, in an animal model of muscular dystrophy. *Biochim Biophys Acta* 1573:216-224.
- Grewal PK, McLaughlan JM, Moore CJ, Browning CA, Hewitt JE (2005) Characterization of the LARGE family of putative glycosyltransferases associated with dystroglycanopathies. *Glycobiology* 15:912-923.
- Gu H, Marth JD, Orban PC, Mossmann H, Rajewsky K (1994) Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265:103-106.
- Haliloglu G, Topaloglu H (2004) Glycosylation defects in muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 17:521-527.
- Hamada T, Tashiro K, Tada H, Inazawa J, Shirozu M, Shibahara K, Nakamura T, Martina N, Nakano T, Honjo T (1996) Isolation and characterization of a novel secretory protein, stromal cell-derived factor-2 (SDF-2) using the signal sequence trap method. *Gene* 176:211-214.
- Hanai R, Mashima K (2003) Characterization of two isoforms of a human DnaJ homologue, HSJ2. *Mol Biol Rep* 30:149-153.
- Hayashi YK, Ogawa M, Tagawa K, Noguchi S, Ishihara T, Nonaka I, Arahata K (2001) Selective deficiency of alpha-dystroglycan in Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Neurology* 57:115-121.
- Hecht NB (1998) Molecular mechanisms of male germ cell differentiation. *Bioessays* 20:555-561.
- Hennessy F, Nicoll WS, Zimmermann R, Cheetham ME, Blatch GL (2005) Not all J domains are created equal: implications for the specificity of Hsp40-Hsp70 interactions. *Protein Sci* 14:1697-1709.
- Henry KR (1985) ON and OFF components of the auditory brainstem response have different frequency- and intensity-specific properties. *Hear Res* 18:245-251.
- Henry MD, Campbell KP (1998) A role for dystroglycan in basement membrane assembly. *Cell* 95:859-870.
- Henry MD, Campbell KP (1999) Dystroglycan inside and out. *Curr Opin Cell Biol* 11:602-607.
- Holzfeind PJ, Grewal PK, Reitsamer HA, Kechvar J, Lassmann H, Hoeger H, Hewitt JE, Bittner RE (2002) Skeletal, cardiac and tongue muscle pathology, defective retinal transmission, and neuronal migration defects in the Large(myd) mouse defines a natural model for glycosylation-deficient muscle - eye - brain disorders. *Hum Mol Genet* 11:2673-2687.
- Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Monk M (1987) HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* 326:292-295.
- Hung NA, Silver MM, Chitayat D, Provias J, Toi A, Jay V, Becker L (1998) Gonadoblastoid testicular dysplasia in Walker-Warburg syndrome. *Pediatr Dev Pathol* 1:393-404.
- Ibraghimov-Beskrovnya O, Ervasti JM, Leveille CJ, Slaughter CA, Sernett SW, Campbell KP (1992) Primary structure of dystrophin-associated glycoproteins linking dystrophin to the extracellular matrix. *Nature* 355:696-702.
- Ichimiya T, Many H, Ohmae Y, Yoshida H, Takahashi K, Ueda R, Endo T, Nishihara S (2004) The twisted abdomen phenotype of *Drosophila* POMT1 and POMT2 mutants coincides with their heterophilic protein O-mannosyltransferase activity. *J Biol Chem* 279:42638-42647.
- Jimenez-Mallebrera C, Brown SC, Sewry CA, Muntoni F (2005) Congenital muscular dystrophy: molecular and cellular aspects. *Cell Mol Life Sci* 62:809-823.
- Jones BJ, Roberts DJ (1968) The quantitative measurement of motor inco-ordination in naive mice using an accelerating rotarod. *J Pharm Pharmacol* 20:302-304.
- Jurado LA, Coloma A, Cruces J (1999) Identification of a human homolog of the *Drosophila* rotated abdomen gene (POMT1) encoding a putative protein O-mannosyl-transferase, and assignment to human chromosome 9q34.1. *Genomics* 58:171-180.
- Kato M, Dobyns WB (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* 12 Spec No 1:R89-96.
- Kaufman MH, Bard JBL (1999) *The Anatomical Basis of Mouse Development*. Academic Press, San Diego, California, USA.
- London, UK.
- Kim DS, Hayashi YK, Matsumoto H, Ogawa M, Noguchi S, Murakami N, Sakuta R, Mochizuki M, Michele DE, Campbell KP, Nonaka I, Nishino I (2004) POMT1 mutation results in defective glycosylation and loss of laminin-binding activity in alpha-DG. *Neurology* 62:1009-1011.
- Kleizen B, Braakman I (2004) Protein folding and quality control in the endoplasmic reticulum. *Curr Opin Cell Biol* 16:343-349.
- Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T (1998) An ancient retrotransposon insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* 394:388-392.
- Kumarapeli AR, Wang X (2004) Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol* 37:1097-1109.
- Kurahashi H, Taniguchi M, Meno C, Taniguchi Y, Takeda S,

- Horie M, Otani H, Toda T (2005) Basement membrane fragility underlies embryonic lethality in fukutin-null mice. *Neurobiol Dis* 19:208-217.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lapidos KA, Kakkar R, McNally EM (2004) The dystrophin glycoprotein complex: signaling strength and integrity for the sarcolemma. *Circ Res* 94:1023-1031.
- Longman C, Brockington M, Torelli S, Jimenez-Mallebrera C, Kennedy C, Khalil N, Feng L, Saran RK, Voit T, Merlini L, Sewry CA, Brown SC, Muntoni F (2003) Mutations in the human LARGE gene cause MDC1D, a novel form of congenital muscular dystrophy with severe mental retardation and abnormal glycosylation of alpha-dystroglycan. *Hum Mol Genet* 12:2853-2861.
- Makela-Bengs P, Jarvinen N, Vuopala K, Suomalainen A, Ignatius J, Sipila M, Herva R, Palotie A, Peltonen L (1998) Assignment of the disease locus for lethal congenital contracture syndrome to a restricted region of chromosome 9q34, by genome scan using five affected individuals. *Am J Hum Genet* 63:506-516.
- Manya H, Chiba A, Yoshida A, Wang X, Chiba Y, Jigami Y, Margolis RU, Endo T (2004) Demonstration of mammalian protein O-mannosyltransferase activity: coexpression of POMT1 and POMT2 required for enzymatic activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:500-505.
- Martin PT (2003) Dystroglycan glycosylation and its role in matrix binding in skeletal muscle. *Glycobiology* 13:55R-66R.
- Martin-Blanco E, Garcia-Bellido A (1996) Mutations in the rotated abdomen locus affect muscle development and reveal an intrinsic asymmetry in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6048-6052.
- Meunier L, Usherwood YK, Chung KT, Hendershot LM (2002) A subset of chaperones and folding enzymes form multiprotein complexes in endoplasmic reticulum to bind nascent proteins. *Mol Biol Cell* 13:4456-4469.
- Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straub V, Matthews KD, Moore SA, Campbell KP (2002) Post-translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature* 418:417-422.
- Michele DE, Campbell KP (2003) Dystrophin-glycoprotein complex: post-translational processing and dystroglycan function. *J Biol Chem* 278:15457-15460.
- Moore SA, Saito F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA, Hoshi T, Campbell KP (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature* 418:422-425.
- Morgenstern JP, Land H (1990) A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. *Nucleic Acids Res* 18:1068.
- Moukhles H, Roque R, Carbonetto S (2000) alpha-dystroglycan isoforms are differentially distributed in adult rat retina. *J Comp Neurol* 420:182-194.
- Muntoni F, Brockington M, Blake DJ, Torelli S, Brown SC (2002) Defective glycosylation in muscular dystrophy. *Lancet* 360:1419-1421.
- Muntoni F, Brockington M, Torelli S, Brown SC (2004) Defective glycosylation in congenital muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 17:205-209.
- Muntoni F, Voit T (2004) The congenital muscular dystrophies in 2004: a century of exciting progress. *Neuromuscul Disord* 14:635-649.
- Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R (2003) Manipulating the mouse embryo. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Nakamura M, Moriya M, Baba T, Michikawa Y, Yamanobe T, Arai K, Okinaga S, Kobayashi T (1993) An endoplasmic reticulum protein, calreticulin, is transported into the acrosome of rat sperm. *Exp Cell Res* 205:101-110.
- Nishino I, Ozawa E (2002) Muscular dystrophies. *Curr Opin Neurol* 15:539-544.
- Nixon B, Lu Q, Wassler MJ, Foote CI, Ensslin MA, Shur BD (2001) Galactosyltransferase function during mammalian fertilization. *Cells Tissues Organs* 168:46-57.
- Patnaik SK, Stanley P (2005) Mouse large can modify complex N- and mucin O-glycans on alpha-dystroglycan to induce laminin binding. *J Biol Chem* 280:20851-20859.
- Pei L (1998) Genomic organization and identification of an enhancer element containing binding sites for multiple proteins in rat pituitary tumor-transforming gene. *J Biol Chem* 273:5219-5225.
- Ponting CP (2000) Novel repeats in ryanodine and IP3 receptors and protein O-mannosyltransferases. *Trends Biochem Sci* 25:48-50.
- Quinn P, Barros C, Whittingham DG (1982) Preservation of hamster oocytes to assay the fertilizing capacity of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 66:161-168.
- Ramirez-Solis R, Davis AC, Bradley A (1993) Gene targeting in embryonic stem cells. *Methods Enzymol* 225:855-878.
- Salamat M, Miosge N, Herken R (1995) Development of Reichert's membrane in the early mouse embryo. *Anat Embryol (Berl)* 192:275-281.

- Sambrook J, Russel DW (2001) Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sasaki T, Yamada H, Matsumura K, Shimizu T, Kobata A, Endo T (1998) Detection of O-mannosyl glycans in rabbit skeletal muscle alpha-dystroglycan. *Biochim Biophys Acta* 1425:599-606.
- Schachter H (2000) The joys of HexNAc. The synthesis and function of N- and O-glycan branches. *Glycoconj J* 17:465-483.
- Schmidt EE, Hanson ES, Capecchi MR (1999) Sequence-independent assembly of spermatid mRNAs into messenger ribonucleoprotein particles. *Mol Cell Biol* 19:3904-3915.
- Schmidt U, Fuessel S, Haase M, Kraemer K, Meye A, Wirth MP (2005) Quantification of C13orf19/P38IP mRNA expression by quantitative real-time PCR in patients with urological malignancies. *Cancer Lett* 225:253-260.
- Sciandra F, Bozzi M, Bianchi M, Pavoni E, Giardina B, Brancaccio A (2003) Dystroglycan and muscular dystrophies related to the dystrophin-glycoprotein complex. *Ann Ist Super Sanita* 39:173-181.
- Sentandreu R, Northcote DH (1969) The characterization of oligosaccharide attachment to threonine and serine in mannan glucopeptides obtained from the cell wall of yeast. *Carbohydrate Res* 10:584-585.
- Sgambato A, Brancaccio A (2005) The dystroglycan complex: From biology to cancer. *J Cell Physiol* 205:163-169.
- Shur BD, Hall NG (1982) Sperm surface galactosyltransferase activities during in vitro capacitation. *J Cell Biol* 95:567-573.
- Silan F, Yoshioka M, Kobayashi K, Simsek E, Tunc M, Alper M, Cam M, Guven A, Fukuda Y, Kinoshita M, Kocabay K, Toda T (2003) A new mutation of the fukutin gene in a non-Japanese patient. *Ann Neurol* 53:392-396.
- Smalheiser NR, Haslam SM, Sutton-Smith M, Morris HR, Dell A (1998) Structural analysis of sequences O-linked to mannanose reveals a novel Lewis X structure in cranin (dystroglycan) purified from sheep brain. *J Biol Chem* 273:23698-23703.
- Spiro RG (2002) Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12:43R-56R.
- Spiro RG, Bhoyroo VD (1980) Studies on the carbohydrate of collagens. Characterization of a glucuronic acid-mannose disaccharide unit from Nereis cuticle collagen. *J Biol Chem* 255:5347-5354.
- Strahl-Bolsinger S, Gentzsch M, Tanner W (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* 1426:297-307.
- Strahl-Bolsinger S, Scheinost A (1999) Transmembrane topology of pmt1p, a member of an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. *J Biol Chem* 274:9068-9075.
- Takeda S, Kondo M, Sasaki J, Kurahashi H, Kano H, Arai K, Misaki K, Fukui T, Kobayashi K, Tachikawa M, Imamura M, Nakamura Y, Shimizu T, Murakami T, Sunada Y, Fujikado T, Matsumura K, Terashima T, Toda T (2003) Fukutin is required for maintenance of muscle integrity, cortical histogenesis and normal eye development. *Hum Mol Genet* 12:1449-1459.
- Tanii I, Toshimori K, Araki S, Oura C (1992) Extra-Golgi pathway of an acrosomal antigen during spermiogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 270:451-457.
- Topaloglu H, Brockington M, Yuva Y, Talim B, Haliloglu G, Blake D, Torelli S, Brown SC, Muntoni F (2003) FKRP gene mutations cause congenital muscular dystrophy, mental retardation, and cerebellar cysts. *Neurology* 60:988-992.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Tulsiani DR (2000) Carbohydrates mediate sperm-ovum adhesion and triggering of the acrosome reaction. *Asian J Androl* 2:87-97.
- Tybulewicz VL, Crawford CE, Jackson PK, Bronson RT, Mulligan RC (1991) Neonatal lethality and lymphopenia in mice with a homozygous disruption of the c-abl proto-oncogene. *Cell* 65:1153-1163.
- van Reeuwijk J, Brunner HG, van Bokhoven H (2005a) GlycO-genetics of Walker-Warburg syndrome. *Clin Genet* 67:281-289.
- van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bemabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen M, Verrips A, Walsh C, Barth P, Brunner H, van Bokhoven H (2005b) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker Warburg syndrome. *J Med Genet*.
- Vicart P, Caron A, Guicheney P, Li Z, Prevost MC, Faure A, Chateau D, Chapon F, Tome F, Dupret JM, Paulin D, Fardeau M (1998) A missense mutation in the alphaB-crystallin chaperone gene causes a desmin-related myopathy. *Nat Genet* 20:92-95.
- Wells L, Hart GW (2003) O-GlcNAc turns twenty: functional implications for post-translational modification of nuclear and cytosolic proteins with a sugar. *FEBS Lett* 546:154-158.
- Willer T, Amselgruber W, Deutzmann R, Strahl S (2002) Cha-

- racterization of POMT2, a novel member of the PMT protein O-mannosyltransferase family specifically localized to the acrosome of mammalian spermatids. *Glycobiology* 12:771-783.
- Willer T, Prados B, Falcon-Perez JM, Renner-Muller I, Przyemek GK, Lommel M, Coloma A, Valero MC, de Angelis MH, Tanner W, Wolf E, Strahl S, Cruces J (2004) Targeted disruption of the Walker-Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:14126-14131.
- Willer T, Valero MC, Tanner W, Cruces J, Strahl S (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol* 13:621-630.
- Williamson RA, Henry MD, Daniels KJ, Hrstka RF, Lee JC, Sunada Y, Ibraghimov-Beskrovnaya O, Campbell KP (1997) Dystroglycan is essential for early embryonic development: disruption of Reichert's membrane in *Dag1*-null mice. *Hum Mol Genet* 6:831-841.
- Wurst W, Joyner AL (1993) "Gene Targeting: A practical approach" Production of targeted embryonic stem cell clones. Oxford University Press, New York.
- Yamamoto T, Kato Y, Kawaguchi M, Shibata N, Kobayashi M (2004) Expression and localization of fukutin, POMGnT1, and POMT1 in the central nervous system: consideration for functions of fukutin. *Med Electron Microsc* 37:200-207.
- Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* 1:717-724.

Targeted disruption of the Walker–Warburg syndrome gene *Pomt1* in mouse results in embryonic lethality

Tobias Willer^{*†}, Belén Prados^{†‡}, Juan Manuel Falcón-Pérez[‡], Ingrid Renner-Müller[§], Gerhard K. H. Przemeck[¶], Mark Lommel^{*}, Antonio Coloma[‡], M. Carmen Valero[‡], Martin Hrabé de Angelis[¶], Widmar Tanner^{*}, Eckhard Wolf[§], Sabine Strahl^{*||}, and Jesús Cruces^{*||}

^{*}Lehrstuhl für Zellbiologie und Pflanzenphysiologie, Universität Regensburg, D-93040 Regensburg, Germany; [†]Departamento de Bioquímica, Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Facultad de Medicina, Universidad Autónoma de Madrid, 28029 Madrid, Spain; [‡]Department of Molecular Animal Breeding and Biotechnology, Gene Center, Ludwig-Maximilians-University, D-81377 Munich, Germany; and [§]GSF–National Research Center for Environment and Health, Institute of Experimental Genetics, D-85764 Neuherberg, Germany

Communicated by Randy Schekman, University of California, Berkeley, CA, August 20, 2004 (received for review April 28, 2004)

O-mannosylation is an important protein modification in eukaryotes that is initiated by an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases. The first mammalian protein O-mannosyltransferase gene described was the human *POMT1*. Mutations in the *hPOMT1* gene are responsible for Walker–Warburg syndrome (WWS), a severe recessive congenital muscular dystrophy associated with defects in neuronal migration that produce complex brain and eye abnormalities. During embryogenesis, the murine *Pomt1* gene is prominently expressed in the neural tube, the developing eye, and the mesenchyme. These sites of expression correlate with those in which the main tissue alterations are observed in WWS patients. We have inactivated a *Pomt1* allele by gene targeting in embryonic stem cells and produced chimeras transmitting the defect allele to offspring. Although heterozygous mice were viable and fertile, the total absence of *Pomt1*^{−/−} pups in the progeny of heterozygous intercrosses indicated that this genotype is embryonic lethal. An analysis of the mutant phenotype revealed that homozygous *Pomt1*^{−/−} mice suffer developmental arrest around embryonic day (E) 7.5 and die between E7.5 and E9.5. The *Pomt1*^{−/−} embryos present defects in the formation of Reichert’s membrane, the first basement membrane to form in the embryo. The failure of this membrane to form appears to be the result of abnormal glycosylation and maturation of dystroglycan that may impair recruitment of laminin, a structural component required for the formation of Reichert’s membrane in rodents. The targeted disruption of *mPomt1* represents an example of an engineered deletion of a known glycosyltransferase involved in O-mannosyl glycan synthesis.

Protein O-mannosylation is an important protein modification in uni- and multicellular eukaryotes (1, 2). In mammals, all O-mannosyl glycans identified so far are variations of the tetrasaccharide NeuAc α 2–3Gal β 1–4GlcNAc β 1–2Man–Ser/Thr, although only a limited number of glycoproteins that carry this modification has been described (reviewed in ref. 2). The best-studied O-mannosylated glycoprotein is α -dystroglycan (α -DG), a component of the dystrophin glycoprotein complex that is implicated in the interaction between extracellular matrix proteins and the cytoskeleton of muscle and neurons (reviewed in refs. 3 and 4). The O-linked carbohydrate chains are involved in the binding of α -dystroglycan (α -DG) to its ligands, such as neuronal and muscle laminin/merosin. In recent years, it has become evident that a group of human neuromuscular diseases associated with hypoglycosylation of α -DG are the result of defects in known glycosyltransferases involved in O-mannosyl glycan synthesis (reviewed in refs. 2 and 5). These include congenital muscular dystrophies (CMDs) with neuronal migration defects, such as Walker–Warburg syndrome (WWS) (6), and muscle–eye–brain disease (MEB) (7). Other similar CMDs that feature abnormal α -DG glycosylation and mutations in putative glycosyltransferases are Fukuyama congenital muscular dystro-

phy (FCMD) (8), congenital muscular dystrophy 1C (MDC1C) (9), and congenital muscular dystrophy 1D (MDC1D) (10).

Protein O-mannosylation is initiated in the endoplasmic reticulum by the transfer of mannose from dolichyl phosphate-activated mannose to serine or threonine residues in secretory proteins (reviewed in ref. 1). This reaction is catalyzed by an evolutionarily conserved family of protein O-mannosyltransferases (PMTs) (11). Although these proteins have been most extensively characterized in yeast (1, 2), PMT homologues have been identified throughout the animal kingdom (with the exception of *Caenorhabditis elegans*). Moreover, in *Drosophila melanogaster*, mutations in the PMT family members *rotated abdomen* (*rt*) and *twisted* (*tw*) affect muscle development (12, 13). In human and mouse, two PMT family members are known to exist, namely *POMT1* (14) and *POMT2* (13). Human *POMT1* and *POMT2* catalyze protein O-mannosyl transfer to α -DG, which serves as a protein substrate (15). Mutations in the *POMT1* gene result in WWS, a severe muscular dystrophy that also involves structural alterations in eye and brain malformations, such as cobblestone lissencephaly (6). Most WWS patients die within the first months of life, with a few surviving to 3 years of age. Patients with mutations in *POMT1* show nuclear and extracellular matrix abnormalities in skeletal muscle, as well as defective glycosylation and the loss of laminin-binding activity in α -DG (16, 17).

Here, we show that during embryonic development, murine *Pomt1* is expressed in the tissues affected in WWS patients. Targeted deletion of *Pomt1* results in early embryonic lethality due to defects in the assembly of Reichert’s membrane. Our results demonstrate the importance of O-mannosyl glycans not only in human disease, but also for critical processes during embryonic development such as the formation of early basement membranes.

Materials and Methods

Characterization and Mapping of the Mouse *Pomt1* Gene. Rapid amplification of cDNA ends PCR was performed on a mouse 17-day embryo marathon-ready cDNA library (Clontech) to generate full-length *Pomt1* cDNA. For chromosomal mapping, an *HphI* polymorphism in exon 20 between *Mus musculus* and *Mus spretus* was used in both panels of backcrosses: EUCIB (BSB) and The Jackson Institute (BSS).

Freely available online through the PNAS open access option.

Abbreviations: CMD, congenital muscular dystrophy; DG, dystroglycan; PMT, protein O-mannosyltransferase; WWS, Walker–Warburg syndrome; En, embryonic day *n*.

Data deposition: The sequence reported in this paper has been deposited in the GenBank database (accession no. AY494857).

[†]T.W. and B.P. contributed equally to this work.

To whom correspondence may be addressed. E-mail: sstrahl@hip.uni-heidelberg.de or jesus.cruces@uam.es.

© 2004 by The National Academy of Sciences of the USA

Pomt1 Expression. Membranes containing RNA from mouse and human tissues (OriGene Technologies, Rockville, MD) and total mouse embryo RNA (Seegene, Del Mar, CA) were hybridized with ³²P-labeled *Pomt1* (base pairs 449–1,193), *Pomt2* (base pairs 659–1,727), or *POMT1* (base pairs 1,398–2,184) cDNA probes. Normalization was performed by using human β -actin and chicken GAPDH.

Whole-Mount *In Situ* Hybridization and Histological Analysis. Embryos were obtained from timed pregnancies, dissected in PBS (pH 7.3), and fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/PBS. Sense and antisense *Pomt1* (base pairs 2,052–2,611) and *brachyury* (base pairs 1–1,765) probes were generated by using the digoxigenin RNA labeling kit (Roche Diagnostics). Whole-mount *in situ* hybridization was carried out as described (18). Stained embryos were cryoprotected overnight at 4°C in 30% sucrose/PBS, embedded in Cryoblock (Mediate Medizintechnik, Burgdorf, Germany), and sectioned (35 μ m) at –25°C. Processed sections were mounted under coverslips in Mowiol (Calbiochem).

Gene Targeting. A 15-kb region of the mouse *Pomt1* gene (intron 2 to exon 20) was isolated from a 129/SvJ genomic library (Mobi-Tec, Göttingen, Germany), by using mouse *Pomt1* cDNA as a probe. To construct the *Pomt1* targeting vector, the plasmid pPNT was used (19). A 4.5-kb *XhoI* fragment (introns 2–9) was cloned into the *XhoI* site of pPNT as the long arm. A 2.3-kb *KpnI-XbaI* fragment, from the intergenic sequence 5' upstream to intron 1 of *Pomt1*, was amplified by PCR from 129/SvJ genomic DNA by using primers a and b (see Supporting Text, which is published as supporting information on the PNAS web site). This fragment was cloned as the short arm into the *XbaI-KpnI* sites of pPNT between the neo and hsv tk cassettes in an opposite orientation.

The targeting construct was linearized and electroporated into embryonic day (E)14.1 embryonic stem (ES) cells. Homologous recombinants were identified by PCR by using primers 1 and 2 (see Supporting Text) and confirmed by Southern blot. Two independent targeted ES clones were obtained and injected into BALB/c blastocysts. Both clones yielded chimeras that transmitted the mutant *Pomt1* allele to their offspring. Heterozygous *Pomt1*^{+/–} progeny were mated, and the offspring was genotyped by Southern blotting and PCR by using primers 3–5 (see Supporting Text). Similarly, embryos from timed pregnancies were genotyped by PCR.

Antibodies and Immunohistochemistry. Rabbit anti-laminin (Sigma) and rat monoclonal anti-entactin (ELM1; Abcam, Cambridge, U.K.) antibodies were used at 1:200 dilutions. Monoclonal anti- α -dystroglycan antibodies (VIA4–1, 1:100; and I1H6, 1:200), polyclonal anti- β -dystroglycan (AP83, 1:50), and anti- α -dystroglycan antibodies (GT20ADG, 1:15) were kindly provided by Kevin Campbell (University of Iowa, Iowa City).

Decidual sacs from wild-type and heterozygous crosses were collected at E6.5 and E7.5, fixed overnight at 4°C in 4% paraformaldehyde/PBS, and cryoprotected or embedded in paraffin. Staining was performed on 7- μ m sections according to the standard protocol for the M.O.M. Basic kit (Vector Laboratories). Primary antibodies were applied in PBS/mouse blocking solution for 1 h at room temperature, and anti-rabbit, anti-rat-Alexa488 (Molecular Probes, 1:1,000), anti-goat-Cy3 (Jackson ImmunoResearch, 1:100), and anti-mouse-biotin (Vector Laboratories, 1:200) secondary antibodies were applied in PBS/mouse blocking solution for 30 min at room temperature. If necessary, a 15-min incubation with streptavidin-Cy3 conjugate (Jackson ImmunoResearch, 1:1,000) followed. Sections were mounted with ProLong Antifade kit (Molecular Probes) and viewed with an epifluorescence Zeiss Axioskop microscope.

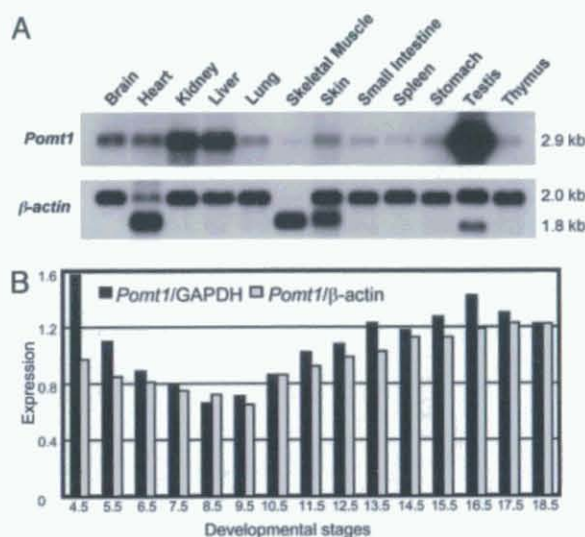


Fig. 1. Expression of mouse *Pomt1* gene. (A) Northern blot analysis of adult tissues hybridized with cDNA probes: *Pomt1* (2.9 kb) and β -actin (2.0 and 1.8 kb). (B) *Pomt1* expression during mouse embryogenesis. Original Northern blot is shown in Fig. 6C. Northern blot was normalized by using GAPDH (black columns) and β -actin (gray columns).

Laser-Capture Microdissection for Genotyping. Tissues from paraffin-embedded embryos were isolated by using a Zeiss Axiovert microscope equipped with a P.A.L.M. microbeam unit (P.A.L.M. Microlaser Technologies, Bernried, Germany). Microdissected material was lysed for 3 h at 55°C in catapult buffer containing 0.5 M EDTA, pH 8.0; 1 M Tris, pH 8.0; 0.5% Igepal CA-630; and 0.2 mg/ml Proteinase K. The heat-inactivated lysate was used as template for PCR genotyping (see above).

Results

Characterization of the Mouse *Pomt1* Gene. We isolated the full-length *Pomt1* cDNA (2,885 bp; GenBank accession no. AY494857) that corresponded to a predicted protein of 724 aa from a mouse embryo cDNA library. The *Pomt1* gene extends over 18,416 bp of genomic DNA, and its organization into 20 exons is conserved between human and mouse (data not shown). The *Pomt1* gene was localized to centromere (cM) 18 of mouse chromosome 2 in the EUCIB backcross (BSB), between the D2Mit120 and D2Mit152 markers, and to cM 20 between the *Abl* and *Pbx3* genes in the BSS backcross panel from The Jackson Laboratory. This 2B chromosomal region had a conserved synteny with human chromosome 9q34.1 where the *POMT1* gene maps. Northern blot analysis identified a single 2.9-kb transcript in all tissues analyzed. However, the expression levels varied from the lowest levels observed in skeletal muscle to high levels of expression in testis (Fig. 1A). The same blot hybridized with *Pomt2* revealed a similar expression pattern (Fig. 6A, which is published as supporting information on the PNAS web site). A similar pattern of human *POMT1* expression was found in adult tissues (Fig. 6B). Northern blot analysis with mRNA from different developmental stages revealed that *Pomt1* is also expressed throughout embryogenesis (Figs. 1B and 6C). High levels of *Pomt1* mRNA were seen at very early stages of development, but one must take care in interpreting these results because this RNA may be the product of contamination with maternal tissues (supplier's note, Seegene, Del Mar, CA). However, the expression of *Pomt1* appeared to decrease slightly during gastrulation and to later increase at the onset of orga-

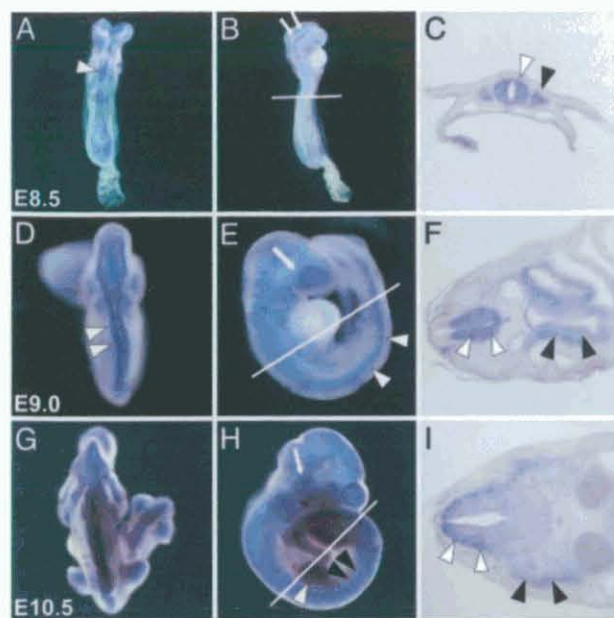


Fig. 2. Whole-mount expression of *Pomt1* in mouse embryos. Whole-mount *in situ* hybridizations (A, B, D, E, G, and H) and representative cryosections (C, F, and I) through the anterior neural tube at the level of the forelimb bud (indicated by a white line in B, E, and H). (A–C) At E8.5, strong *Pomt1* expression is found along the neural tube (white arrowhead) and in the dorsal aspects of the neural fold (arrows). Expression was also detected in the somites (black arrowhead). (D–F) At E9.0, strong expression was seen in the ventral part of the neural tube (white arrowheads), in the developing eye (white arrow), and in the gut endoderm (black arrowheads). (G and H) At E10.5, high levels of *Pomt1* mRNA were detected in the somites (black arrowheads), limb buds (white arrowhead), and trigeminal ganglion (white arrow). (I) Pronounced *Pomt1* expression in the mantle layer of the dorsal neural tube (white arrowheads), as well as in the dermomyotome (black arrowheads), was verified in the E10.5 section.

nogenesis at E9.5, suggesting an important role for *Pomt1* throughout embryogenesis.

Mouse *Pomt1* Is Expressed in WWS-Related Tissues During Early Embryogenesis. To examine the expression of *Pomt1* during mouse embryogenesis in more detail, we performed whole-mount *in situ* hybridizations on embryos from different developmental stages (E7.5–10.5). At E7.5, *Pomt1* transcripts could not be detected by *in situ* hybridization (data not shown). At later stages, low-level expression of *Pomt1* mRNA was relatively ubiquitous, whereas higher levels of *Pomt1* expression were observed in a specific and dynamic pattern. At E8.5, intense *Pomt1* expression was detected in the neuronal tissues. Transcripts were found throughout the neural tube (Fig. 2A and C) and in the dorsal aspects of the neural folds of the future midbrain region (Fig. 2B). In addition, *Pomt1* was expressed in the somites (Fig. 2C). At E9.0, pronounced expression of *Pomt1* transcripts was seen along the neural tube (Fig. 2D and E) and in the developing eye (Fig. 2E). In cross sections of E9.0 embryos, *Pomt1* transcripts were predominantly detected in the ventral domain of the neural tube, including the region from which motoneurons emerge. Furthermore, *Pomt1* was expressed in the floor plate, notochord, and gut endoderm (Fig. 2F). At E10.5, *Pomt1* transcripts were detected in the somites, the limb-bud mesenchyme, and the developing trigeminal ganglion (Fig. 2G and H). In cross sections anterior to the forelimb bud, *Pomt1* expression was observed in the mantle layer of the dorsal neural tube and the dermomyotome of the somites (Fig. 2I). This

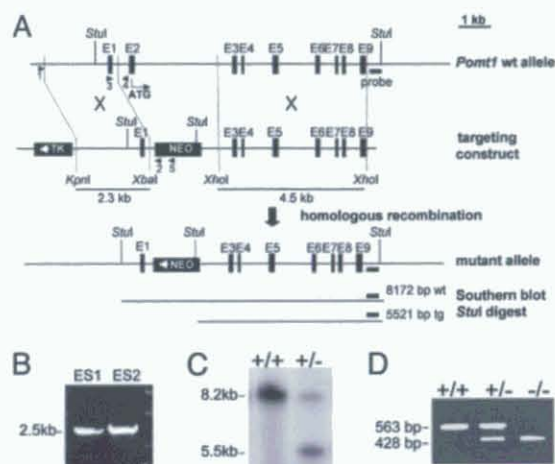


Fig. 3. Targeted disruption of the *Pomt1* gene. (A) Schematic representation of the targeting strategy: the genomic locus, the targeting construct, and the expected mutant *Pomt1* allele after homologous recombination. Selectable markers: herpes simplex virus thymidine kinase gene (TK) and neomycin gene (NEO). The short (2.3-kb) and long (4.5-kb) arms for homologous recombination are represented. PCR primers are represented by arrows. (B) Primers 1 and 2 were used to identify two targeted embryonic stem clones after homologous recombination. (C) Southern blot analysis of genomic DNA from mouse tail tissue. Endogenous (8.2-kb) and targeted (5.5-kb) *Pomt1* alleles. (D) PCR genotyping of embryos from timed matings. Primers 3 and 4 identify the endogenous allele, whereas primers 3 and 5 identify the targeted allele.

precise expression pattern suggests that *Pomt1* is involved in the development of the muscles, the nervous system, and the eye, which is consistent with the neuronal, muscle, and eye abnormalities found in WWS patients (6).

Loss of *Pomt1* Results in Early Embryonic Lethality. The disruption of the *Pomt1* gene was achieved by replacing exon 2, containing the start codon conserved among all vertebrates instead of the putative start codon located in exon 1, with a neomycin resistance gene (Fig. 3A). Successfully targeted clones were identified by PCR and Southern blotting (Fig. 3B and C and data not shown). Two independent embryonic stem cell clones were used to generate chimeric mice that transmitted the mutant *Pomt1* allele to their offspring. *Pomt1*^{+/-} heterozygous mice developed normally and were fertile. The progeny of heterozygous intercrosses were 31% wild-type and 69% heterozygous *Pomt1* (Table 1), an ~1:2 ratio that is indicative of the Mendelian inheritance for a recessive embryonic lethal trait. To determine when homozygous mutant embryos die, we isolated embryos at different stages and genotyped them by PCR (Fig. 3D). Blastocysts at E3.5 were flushed from the uterus and genotyped directly or

Table 1. Offspring and embryo genotypes from different heterozygous matings

Developmental stage	Total	Genotypes		
		+/+	+/-	-/-
Adult mice	81	25 (31%)	56 (69%)	0
E10.5	38	15	23	0
E9.5	48	8	32	8*
E8.5	44	9	24	11*
E7.5	26	7	12	7*
E3.5 (blastocysts)	109	23	69	17

*As development proceeded, *Pomt1* null mutants showed progressive growth retardation and degradation.

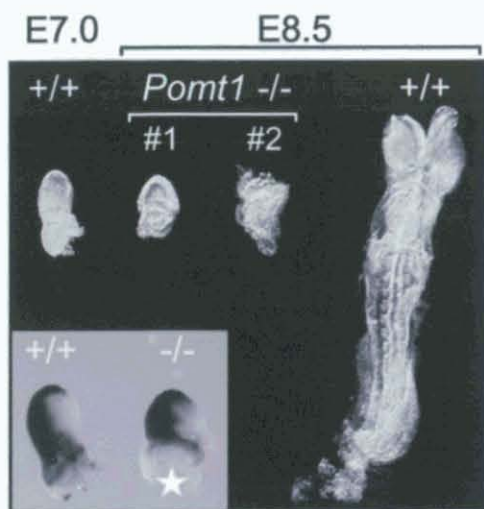


Fig. 4. Morphology of wild-type and *Pomt1*^{-/-} embryos. Representative littermates from an E8.5 *Pomt1* heterozygous intercross are shown. PCR genotyping confirmed *Pomt1*^{-/-} null mutants. *Pomt1*-deficient embryos display severe growth retardation presumably due to a developmental block in E6–7. For size comparison, an additional E7.0 wild-type embryo is presented. (Inset) Whole-mount *in situ* hybridization with the gastrulation marker *brachyury*. The asterisk indicates a missing part of the extraembryonic ectoderm used for PCR genotypization.

after *in vitro* culture. Homozygous mutant blastocysts with normal trophoblast outgrowth were indistinguishable from wild-type and heterozygous littermates (data not shown) and were identified in the expected Mendelian ratio of 1:2:1 (Table 1). Genotyping of embryos from E7.5 to E9.5 also revealed a 1:2:1 Mendelian ratio (Table 1), although *Pomt1*^{-/-} embryos were significantly smaller and became increasingly disorganized with age (Fig. 4). *Pomt1*^{-/-} embryos isolated at E8.5 displayed a variable degree of morphological abnormalities. Some mutant embryos appeared to remain at the egg-cylinder stage reminiscent of E6.5 embryos; others developed beyond that stage but appeared to suffer a later developmental block (Fig. 4, #1 and #2). Gastrulation did not seem to be impaired, because whole-mount *in situ* hybridization with *brachyury* revealed no obvious abnormalities (Fig. 4 Inset). Finally, *Pomt1*^{-/-} embryos were resorbed during pregnancy, such that at E10.5, no tissue from homozygous mutant embryos could be recovered (Table 1). Taken together, these results suggest that *Pomt1* fulfills a crucial function during early embryogenesis.

Loss of *Pomt1* Results in the Disruption of Reichert's Membrane. One known protein substrate of POMT1 is α -DG. The posttranslational glycosylation of the α -DG protein, including the addition of *O*-mannosyl glycan chains, is critical in determining its ligand-binding properties (4, 17, 20). In mice, α -DG is a component of Reichert's membrane, one of the first basement membranes to form in the embryo (21, 22). We determined whether glycosylation of α -DG might be affected in *Pomt1*^{-/-} embryos in genotyped sections from E7.5 homozygous embryos. In wild-type and heterozygous embryos, α -DG glyco-specific antibodies VIA4-1 and IIH6 mainly recognized Reichert's membrane and the maternal decidual cells surrounding the embryo (Fig. 5 *Ab* and *Bb*, and data not shown). In contrast, the α -DG glycoepitope was detected neither in Reichert's membrane nor in the embryonic tissue in sections of *Pomt1*^{-/-} embryos (Fig. 5 *Af* and *Bf*), although the expression of this α -DG epitope could be observed in the surrounding maternal decidual cells.

These data suggested that, *in vivo*, POMT1 contributes to the major mannosyltransferase activity required for the incorporation of *O*-mannosyl glycans into α -DG. Immunofluorescence with antibodies directed against the protein core of the α - and β -subunit of dystroglycan, respectively, revealed a reduction of both DG proteins in Reichert's membrane in *Pomt1* null mutants (Fig. 5 *Ac*, *Ag*, *Bc*, and *Bg*), indicating incorrect maturation or targeting due to hypoglycosylation.

The absence of *O*-mannosyl glycans and the reduced level of DG proteins might affect the distribution of laminin and thus the formation of basement membranes such as Reichert's membrane. Laminin, as well as the laminin-binding protein nidogen/entactin (23), was readily detected in the Reichert's membrane of wild-type embryos (Fig. 5 *Ad* and *Bd*). In *Pomt1*^{-/-} embryos, the levels of laminin and nidogen were significantly reduced, and the distribution was disrupted, becoming discontinuous and in parts patchy (Fig. 5 *Ah* and *Bh*).

In summary, the targeted deletion of *Pomt1* in mice impairs basement membrane formation, manifested by the disruption of Reichert's membrane. The failure of this membrane to protect the embryo is reflected by the fact that maternal red blood cells can be found in the yolk sacs of *Pomt1* null mutant embryos (data not shown).

Discussion

We have generated a knockout mouse model of a known glycosyltransferase, *Pomt1*. Several glycosyltransferases are involved in CMDs in humans. Mutations in *POMT1* are responsible for WWS, a severe recessive CMD that is combined with ocular and retinal abnormalities and brain defects that include type II lissencephaly (6). Children born with WWS generally do not survive past the age of 3 years. The expression of *Pomt1* in the neural tube, dermomyotome, and developing eye during mouse embryonic development emphasizes the importance of *Pomt1* in all of the tissues most affected in WWS patients. However, the early embryonic lethality observed in *Pomt1*^{-/-} null mutants contrasts with the effects of the mutations found in WWS patients. The reason that the murine *Pomt1*^{-/-} null mutation results in a notably more severe phenotype than the mutations seen in human WWS patients may well lie in the defects observed in Reichert's membrane. Although Reichert's membrane is a feature particular to rodent embryos (21, 22), α -DG glycosylation might be a general and crucial prerequisite for the correct development of basement membranes also in humans. This is supported by the glia limitans defects observed in WWS patients (6).

It is widely accepted that the carbohydrate moiety in general and *O*-mannosyl glycans in particular play a crucial role in determining the ligand-binding properties of α -DG. It has been reported that laminin binding to α -DG is reduced or almost completely lost in muscle tissue of WWS, muscle-eye-brain (MEB) disease, Fukuyama CMD (FCMD), and congenital muscular dystrophy 1C (MDC1C) patients (9, 17, 20). Furthermore, *in vitro* correct glycosylation of DG is crucial for protein processing and targeting to the cell surface (24). *In vivo* targeting defects of α - and β -DG due to hypoglycosylation are observed in nonmuscle tissue, such as hypoplasia of the spontaneous mouse mutant (*myd*), which represents a null mutation of the putative glycosyltransferase LARGE and shows a relevant CMD phenotype (20, 25).

Interestingly, we found a reduction of both dystroglycan subunits (α - and β -chains) in the Reichert's membrane of *Pomt1*^{-/-} embryos, which obviously resulted in aberrant recruitment of laminin to Reichert's membrane. In the dystroglycan null mutant embryo, the lack of laminin leads to a loss of this membranes' integrity and causes embryonic lethality early in gastrulation (22). Thus, the lethal phenotype observed in the *Pomt1* mutant embryos mimics the dystroglycan knockout

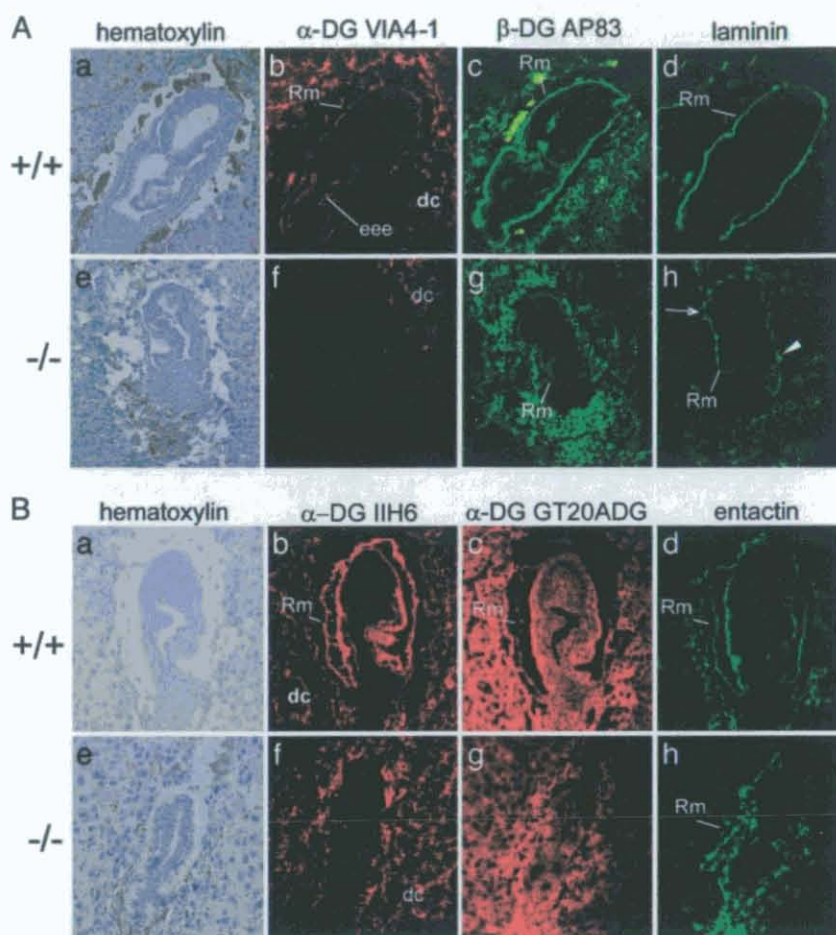


Fig. 5. Immunohistochemical characterization of extracellular matrix components in *Pomt1*^{-/-} mutant embryos. Sagittal sections of paraffin-embedded E7.5 (A) or frozen E6.5 (B) embryos were stained with hematoxylin and analyzed with anti-α-DG antibodies directed against a glycoepitope (VIA4-1, IIH6) or the protein core (GT20ADG) and anti-β-DG (AP83), anti-laminin, and anti-nidogen/entactin antibodies, as indicated. Wild-type embryos (A and B a-d) and independent *Pomt1* null mutants (A and B e-h) are shown. In *Pomt1*^{-/-} embryos, the glycoepitope is missing in all embryo-derived cellular structures, although it is still present in the decidual cells. Discontinuous (arrows) and patchy (arrowhead) laminin and nidogen/entactin staining of the mutant embryos indicates a defect in the formation of Reichert's membrane. Genotypes were determined by PCR genotyping of laser-captured material. Rm, Reichert's membrane; eee, extraembryonic ectoderm; dc, maternal decidual cells.

model. Furthermore, by considering these data together, we assume that the early embryonic lethality observed in *Pomt1* null mutant mice is due to the failure of Reichert's membrane to function correctly as a filter, allowing free access of nutrients to the embryo while excluding maternal cells (21).

Because Reichert's membrane is specific to rodents, it may be difficult to establish appropriate mouse models for glycosylation disorders associated with CMDs. One possible approach to circumvent this problem would be the use of tissue- and stage-specific gene disruption, as recently attempted for α-DG (26, 27). The conditional ablation of dystroglycan from the embryonic but not the extraembryonic tissues that synthesize the components of Reichert's membrane overcomes embryonic lethality. However, although live offspring are born, the pups are severely affected and poorly viable.** This provides further evidence that the formation of a functional Reichert's membrane at the egg cylinder stage is the bottleneck, which mutations in dystroglycan and/or in its modifying glycosyltransferases are

unable to overcome. Indeed, another mouse mutant also suffers early embryonic lethality at around E6.5–7.5, in that the putative glycosyltransferase *fukutin* gene is disrupted (28). In humans, *Fukutin* mutations cause FCMD (8) and a more severe spectrum of WWS-like symptoms (29, 30).

It seems that POMT1 enzymatic activity is completely lost in *Pomt1*^{-/-} deficient embryos. In yeast, members of the PMT family form specific protein complexes (31), and it has been suggested that in mammals, both POMT1 and POMT2 have to be present to confer maximal activity (15). Our Northern blot data support this suggestion, because both *Pomt1* and *Pomt2* have similar expression patterns. This may explain why residual POMT2 activity cannot compensate for POMT1 deficiency. The binding of α-DG to its ligands (e.g., laminin α2) is mediated via its sialyl-terminated carbohydrate chains (3, 32). Approximately 70% of these chains are of the O-mannosyl type, whereas the rest are mucin-type sugars initiated at an N-acetylgalactosamine sugar residue (33). Our data from mouse embryos, in conjunction with a previous study on human WWS muscle (17), emphasize that in nonmuscle tissue, O-mannosyl glycans are crucial for DG maturation and/or targeting to the cell surface, whereas in muscle, they mainly affect binding of α-DG to laminin. Neither the residual α-DG sugar moiety nor other

**Barresi, R., Satz, J. S., Sawatzki, S. M., Durbecq, M., Cohn, R. D., Henry, M. D., Moore, S. A., Tallquist, M. D., Soriano, P. & Campbell, K. P. (2003) *Mol. Biol. Cell* 14, 390a (abstr.).

laminin receptors like $\beta 1$ integrin can compensate for the loss of *O*-mannosyl glycan-mediated binding (4). The recruitment of laminin to α -DG is critical for initial self assembly and cluster formation during basement membrane formation (34, 35). Laminin 1 is the major laminin found at early stages of basement membranes. The absence of the laminin 1 chain results in early embryonic death by E7 (36). Subsequently, such laminin clusters mediate the deposition of other structural extracellular matrix molecules, for example, nidogen/entactin or collagen IV (23).

Because α -DG is the best-characterized *O*-mannosylated protein to date, our data on *Pomt1* expression, together with the knockout phenotype, seem to be directly related to α -DG function and the observed loss of its *O*-mannosyl sugar moieties. Besides the known function of *O*-mannosyl glycans in laminin binding, our study provides *in vivo* evidence that *O*-mannosylation is important for proper maturation and/or targeting of the protein to the cell

surface. Taken together, our study demonstrates the essential role of *O*-mannosyl glycans not only in disease but also for early rodent development and the formation of early basement membranes.

We thank L. A. Pérez Jurado and A. Cortés for assistance with initial *Pomt1* studies and knockout vector construction, respectively. We thank C. Endres, M. Priesmeier-Grädl, N. Rieger, M. Neumann, and N. Zink for excellent technical assistance and P. Renner for expert care of the animals. We are grateful to Kevin Campbell for generously providing antibodies. We thank R. Barresi for helpful discussions and M. Sefton for critical reading of the manuscript. This work was supported by grants from Spanish Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología, Fondo de Investigaciones Sanitarias, the Comunidad de Madrid, the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Grant SFB521), Fond der Chemischen Industrie, and the German National Genome Research Network. B.P. is a Ciencia y Tecnología and Fondo de Investigaciones Sanitarias fellow, and J.M.F. and M.C.V. were Comunidad de Madrid fellows.

- Strahl-Bolsinger, S., Gentzsch, M. & Tanner, W. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1426**, 297–307.
- Willer, T., Valero, M. C., Tanner, W., Cruces, J. & Strahl, S. (2003) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 621–630.
- Endo, T. & Toda, T. (2003) *Biol. Pharmacol. Bull.* **26**, 1641–1647.
- Michele, D. E. & Campbell, K. P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 15457–15460.
- Muntoni, F., Brockington, M., Torelli, S. & Brown, S. C. (2004) *Curr. Opin. Neurol.* **17**, 205–209.
- Beltrán-Valero de Bernabé, D., Currier, S., Steinbrecher, A., Celli, J., van Beusekom, E., van der Zwaag, B., Kayserili, H., Merlini, L., Chitayat, D., Dobyns, W. B., et al. (2002) *Am. J. Hum. Genet.* **71**, 1033–1043.
- Yoshida, A., Kobayashi, K., Manya, H., Taniguchi, K., Kano, H., Mizuno, M., Inazu, T., Mitsuhashi, H., Takahashi, S., Takeuchi, M., et al. (2001) *Dev. Cell* **1**, 717–724.
- Hayashi, Y. K., Ogawa, M., Tagawa, K., Noguchi, S., Ishihara, T., Nonaka, I. & Arahata, K. (2001) *Neurology* **57**, 115–121.
- Brockington, M., Blake, D. J., Prandini, P., Brown, S. C., Torelli, S., Benson, M. A., Ponting, C. P., Estournet, B., Romero, N. B., Mercuri, E., et al. (2001) *Am. J. Hum. Genet.* **69**, 1198–1209.
- Longman, C., Brockington, M., Torelli, S., Jimenez-Mallebrera, C., Kennedy, C., Khalil, N., Feng, L., Saran, R. K., Voit, T., Merlini, L., et al. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 2853–2861.
- Strahl-Bolsinger, S., Immervoll, T., Deutzmann, R. & Tanner, W. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 8164–8168.
- Martín-Blanco, E. & García-Bellido, A. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 6048–6052.
- Willer, T., Amselgruber, W., Deutzmann, R. & Strahl, S. (2002) *Glycobiology* **12**, 771–783.
- Jurado, L. A., Coloma, A. & Cruces, J. (1999) *Genomics* **58**, 171–180.
- Manya, H., Chiba, A., Yoshida, A., Wang, X., Chiba, Y., Jigami, Y., Margolis, R. U. & Endo, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 500–505.
- Sabatelli, P., Columbaro, M., Mura, I., Capanni, C., Lattanzi, G., Maraldi, N. M., Beltrán-Valero de Bernabé, D., van Bokoven, H., Squarzone, S. & Merlini, L. (2003) *Biochim. Biophys. Acta* **1638**, 57–62.
- Kim, D. S., Hayashi, Y. K., Matsumoto, H., Ogawa, M., Noguchi, S., Murakami, N., Sakuta, R., Mochizuki, M., Michele, D. E., Campbell, K. P., et al. (2004) *Neurology* **62**, 1009–1011.
- Sporle, R. & Schughart, K. (1998) *Dev. Genet.* **22**, 359–373.
- Tybulewicz, V. L., Crawford, C. E., Jackson, P. K., Bronson, R. T. & Mulligan, R. C. (1991) *Cell* **65**, 1153–1163.
- Michele, D. E., Barresi, R., Kanagawa, M., Saito, F., Cohn, R. D., Satz, J. S., Dollar, J., Nishino, I., Kelley, R. I., Somer, H., et al. (2002) *Nature* **418**, 417–421.
- Salamat, M., Miosge, N. & Herken, R. (1995) *Anat. Embryol.* **192**, 275–281.
- Williamson, R. A., Henry, M. D., Daniels, K. J., Hrstka, R. F., Lee, J. C., Sunada, Y., Ibraghimov-Beskrovnaia, O. & Campbell, K. P. (1997) *Hum. Mol. Genet.* **6**, 831–841.
- Timpl, R. & Brown, J. C. (1996) *BioEssays* **18**, 123–132.
- Esapa, C. T., Bentham, G. R. B., Schroeder, J. E., Kroeger, S. & Blake, D. J. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 209–216.
- Grewal, P. K. & Hewitt, J. E. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1573**, 216–224.
- Moore, S. A., Saito, F., Chen, J., Michele, D. E., Henry, M. D., Messing, A., Cohn, R. D., Ross-Barta, S. E., Westra, S., Williamson, R. A., et al. (2002) *Nature* **418**, 422–425.
- Cohn, R. D., Henry, M. D., Michele, D. E., Barresi, R., Saito, F., Moore, S. A., Flanagan, J. D., Skwarchuk, M. W., Robbins, M. E., Mendell, J. R., et al. (2002) *Cell* **110**, 639–648.
- Takeda, S., Kondo, M., Sasaki, J., Kurahashi, H., Kano, H., Arai, K., Misaki, K., Fukui, T., Kobayashi, K., Tachikawa, M., et al. (2003) *Hum. Mol. Genet.* **12**, 1449–1459.
- Silan, F., Yoshioka, M., Kobayashi, K., Simsek, E., Tunc, M., Alper, M., Cam, M., Guven, A., Fukuda, Y., Kinoshita, M., et al. (2003) *Ann. Neurol.* **53**, 392–396.
- de Bernabé, D. B., van Bokhoven, H., van Beusekom, E., Van den Akker, W., Kant, S., Dobyns, W. B., Cormand, B., Currier, S., Hamel, B., Talim, B., et al. (2003) *J. Med. Genet.* **40**, 845–848.
- Giribach, V. & Strahl, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 12554–12562.
- Winder, S. J. (2001) *Trends Biochem. Sci.* **26**, 118–124.
- Sasaki, T., Yamada, K., Matsumura, T., Shimizu, T., Kobata, A. & Endo, T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1425**, 599–606.
- Henry, M. D. & Campbell, K. P. (1998) *Cell* **95**, 859–870.
- Henry, M. D., Satz, J. S., Brakebusch, C., Costell, M., Gustafsson, E., Fassler, R. & Campbell, K. P. (2001) *J. Cell Sci.* **114**, 1137–1144.
- Miner, J. H., Li, C., Mudd, J. L., Go, G. & Sutherland, A. E. (2004) *Development (Cambridge, U.K.)* **131**, 2247–2256.

Fe de erratas:

Las páginas 10, 28, 40, 68 y 80 no han sido impresas intencionadamente porque van en blanco.

